

Cátia Daniela Quadrado Gomes

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2015

Cátia Daniela Quadrado Gomes

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

Universidade Fernando Pessoa

Faculdade Ciências da Saúde

Porto, 2015

Cátia Daniela Quadrado Gomes

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

(Cátia Daniela Quadrado Gomes)

Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos
para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Sumário

O objetivo deste trabalho é demonstrar que mesmo com a terapia disponível hoje em dia para doentes infectados com VIH, a existência de uma vacina iria melhorar não só a sua qualidade de vida mas também iria prevenir novas infeções e assim diminuir a propagação desta infeção e ajudar a proteger os indivíduos que ainda não estão infectados.

Este trabalho está dividido em duas partes: a primeira sobre o vírus e a segunda sobre a vacina. Os temas abordados vão desde a história da descoberta do vírus à história da vacina, passando pelas características do vírus que fazem com que o desenvolvimento desta vacina se torne tão complicado. São também mencionados os ensaios mais relevantes como o STEP, o HVTN 505 e o RV144, que foi o único a conseguir resultados positivos até hoje.

Por fim, apresentam-se alguns conceitos que estão a ser pesquisados para o desenvolvimento de novas vacinas, bem como alguns estudos realizados recentemente em *Rhesus macaques* que apresentaram resultados animadores. Mesmo após estas três décadas ainda há muitos ensaios a decorrer demonstrando que as técnicas podem sempre ser aprimoradas e que há novas técnicas para experimentar.

Palavras-chaves: VIH, SIDA, vacinas, RV144, bNAbs

Abstract

The objective of this work is to demonstrate that even with therapy available today for infected patients with VIH, the existence of a vaccine would improve not only their quality of life but would also prevent new infections and help reduce the spread of infection and help protect individuals who are not yet infected.

This work has two parts: the first about the virus and the second about the vaccine. The topics range from virus discovery to the history of vaccine, through the characteristics of the virus that cause the development of this vaccine so complicated. The most famous trials are also mentioned as STEP, the HVTN 505 and RV144, which was the only one to achieve positive results to date.

Finally, it is presented some concepts that are being researched for developing new vaccines, as well as some recent studies in *Rhesus macaques* that showed encouraging results. Even after these three decades there are still many trials being conducted demonstrating that the techniques can always be improved and that there are new techniques to try.

Key-words: VIH, AIDS, vaccines, RV144, bNAbs

Dedicatórias

Aos meus pais, Manuel e Lina Gomes, por me proporcionarem esta experiência e espero poder provar-lhes que todos os sacrifícios valeram a pena.

Aos meus tios, César e Ana Quadrado, que amavelmente me aceitaram em sua casa durante cinco anos, tratando-me sempre como sua filha.

Obrigada por tudo pois sem a vossa ajuda não seria possível a elaboração e conclusão deste mestrado. Obrigada pelo apoio, força e amor.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer ao meu orientador, Prof. Doutor Ricardo Magalhães e ao Drº Joaquim Oliveira, médico nas infetocontagiosas dos HUC, por toda a ajuda e dedicação.

Um enorme agradecimento a todas as minhas amigas que acompanharam o meu percurso nestes últimos cinco anos. O vosso apoio, carinho e amizade tornaram este caminho mais fácil e divertido.

À minha família pois são o principal pilar da minha vida e sem o seu apoio incondicional este trajeto académico, longe de casa, não teria sido possível.

Índice

Índice de Ilustrações.....	viii
Índice de Tabelas	ix
Lista de abreviações	x
Introdução	1
Parte I: O Vírus da Imunodeficiência Humana.....	3
I. A infecciosidade do VIH	4
1) A descoberta do VIH	4
2) Transmissão	6
3) A infecção por VIH	7
4) Distinguir VIH seropositivo e SIDA	9
II. Características do vírus	11
1) Classificação do vírus	11
2) Morfologia	12
3) Ciclo de vida.....	15
4) Variabilidade genética	19
Parte II: O desenvolvimento da vacina	20
I. Necessidade da vacina.....	21
1) Epidemiologia do VIH	21
2) Porquê uma vacina?.....	21
3) Importância da vacina para o VIH.....	21
II. Estratégias para a pesquisa de vacinas.....	24
1) Vacinas Preventivas e Terapêuticas	24
2) Vacinas Vivas e Inativadas.....	24

3) Adjuvantes	27
4) Como a vacina confere imunização.....	28
III. Desenvolvimento de uma nova vacina	29
1) Ensaios Pré-clínicos.....	30
2) Ensaios Clínicos	30
i. Ensaios de Fase I.....	31
ii. Ensaios de Fase II	31
iii. Ensaios de Fase III.....	31
iv. Registo	32
v. Ensaios de Fase IV.....	32
IV. História da vacina para o VIH	33
1) O ensaio STEP.....	34
2) O ensaio RV144	35
3) O ensaio HVTN 505.....	36
V. Os obstáculos da vacina	389
1) Tempo de desenvolvimento e Financiamento	39
2) Dificuldades ao desenvolvimento da vacina	41
3) Administração da vacina	41
4) A estrutura da vacina	41
i. Variabilidade genética do vírus e fuga ao Sistema Imunológico.....	41
ii. Morfologia do VIH	42
iii. Resposta imunológica	43
iv. Sterilising immunity	43
v. Modelos animais	44
VI. O Futuro	45
1) Alterações ao ensaio RV144.....	46
2) O ensaio REDUC	47

3) Broadly Neutralizing Antibodies.....	47
4) Novas técnicas	50
VII. Conclusão	51
VIII. Referências Bibliográficas.....	52

Índice de Ilustrações

Ilustração 1 - Representação da estrutura do VIH.....	12
Ilustração 2 - Organização esquemática do genoma do VIH-1.....	14
Ilustração 3 - Organização esquemática do genoma do VIH-2.....	14
Ilustração 4 - Esquema do ciclo viral do VIH.....	16
Ilustração 5 - Esquema representativo das diferenças entre a morte por apoptose e piroptose.....	18
Ilustração 6 - Esquema representativo da imunidade de grupo.....	22
Ilustração 7 - Esquema representativo de vários valores de R nought.....	23
Ilustração 8 - Esquema dos tipos de vacinas.....	26
Ilustração 9 - Esquema de um ensaio clínico.....	30
Ilustração 10 - Vacina prime boost.....	36
Ilustração 11 - Investimento em Investigação e Desenvolvimento em Vacinas Terapêuticas em 2012 e 2013.....	40
Ilustração 12 - Tipos de Vacinas em Ensaio Clínicos em 2015.....	46
Ilustração 13 - Esquema do trímico env realçando os epítomos que se ligam aos bNAbs.....	49

Índice de Tabelas

Tabela 1 - Número de infeções por VIH por data de diagnóstico em Portugal (1983 a 2012).....	5
Tabela 2 - Números de casos de infeção por VIH em Portugal, por ano de diagnóstico e por estágio, de 1983 a 2012.	9
Tabela 3 - Resumo esquemático das proteínas virais.	14
Tabela 4 - Principais implicações das proteínas acessórias na replicação viral.	15
Tabela 5 - Estratégias para o desenvolvimento da vacina para o VIH.	27
Tabela 6 - Investimentos Anuais em Investigação e Desenvolvimento de Vacinas Preventivas para o VIH entre 2000 e 2013 (\$US milhões).	40

Lista de abreviações

a.a	Aminoácidos
ADME	Absorção, Distribuição, Metabolização e Excreção
ARS	Acute Retroviral Syndrome
bNAbs	Anticorpos Altamente Neutralizantes
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EMA	European Medicines Agency
EUA	Estados Unidos da América
FDA	U.S Food and Drug Administration
HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
VIH / VIH	Vírus da Imunodeficiência Humana
HVTN	VIH Vaccines Trial Network
IAVI	International AIDS Vaccine Initiative
IFI16	Interferon-gama inducible protein 16
IL	Interleucinas
MHRP	Military VIH Vaccine Research Program
NHS	National Health Service
NIAID	National Institute of Allergy and Infectious Diseases
NIH	National Institutes of Health
P5	Pox-Protein Public Private Partnership
rAd5	Adenovírus recombinantes do serótipo 5
RhCMV	Citomegalovírus de Rhesus
RNA	Ácido Ribonucleico
TR/RT	Transcriptase Reversa
S.I	Sistema Imunológico
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
SIV	Vírus da Imunodeficiência Símia

Introdução

O objeto de estudo deste trabalho é o desenvolvimento de uma vacina contra o VIH. Desta forma, o trabalho encontra-se dividido em duas partes sendo a primeira focada no vírus e a segunda focada no desenvolvimento da vacina. A primeira parte surge como contextualização para a segunda e vão ser abordados temas como as características do vírus, assim como a evolução da infecção por VIH até à fase SIDA. Na segunda parte pode-se encontrar uma breve história das vacinas, os principais obstáculos sentidos pelos investigadores, bem como alguns possíveis caminhos futuros.

Este trabalho pretende elucidar sobre a necessidade urgente de haver uma vacina para o VIH, bem como explicar as complicações associadas ao seu desenvolvimento e o porquê de ainda não haver nenhuma disponível no mercado.

A pesquisa para a cura da SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) vem desde a década de 80. Foi em 1981, nos Estados Unidos, que foram descritos os primeiros casos desta doença que ataca o sistema imune do hospedeiro, em homens homossexuais (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000). Só em 1983 é que foi associado a presença de um retrovírus à patologia em causa, sendo o agente viral identificado como o VIH (do inglês Human Immunodeficiency Virus: Vírus da Imunodeficiência Humana) e, em 1985, começaram os estudos para o desenvolvimento de uma vacina (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Boskey, 2014a).

Tendo em conta que esta doença é transmitida pessoa a pessoa, a vacinação poderia desempenhar um papel fundamental no controlo da sua propagação e ajudar a proteger os indivíduos que não podem tomar a vacina (NIAID, 2010; Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015a).

A vacina contra o VIH – que se encontra em estudo há trinta anos – ainda não foi desenvolvida com sucesso, apesar das várias abordagens (Boskey, 2014a; Boskey, 2014b; Schooley & Veronesi, 2000), tendo-se obtido apenas um resultado ligeiramente positivo com o ensaio RV144 com uma eficácia de 31,2% na proteção contra a infeção pelo VIH-1 (Supachai et al., 2009).

As dificuldades que se apresentam ao desenvolvimento desta vacina têm carácter monetário, no entanto esta dificuldade deve-se às características do vírus: a grande

variabilidade dos tipos de VIH, na falta de imunidade natural ao vírus, bem como a pouca fiabilidade dos modelos animais usados (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b).

Os resultados do ensaio RV144 criaram boas expectativas para o futuro e vários grupos de investigadores estão a planear alterar o primeiro regime de forma a obter resultados mais animadores (AVAC, 2015b). Outros caminhos estão a ser investigados e passam por induzir anticorpos altamente neutralizantes (Watkins, 2012), utilizar sequências ancestrais ou de consenso de forma a minimizar as diferenças genéticas entre as estirpes (Gaschen, 2002) ou utilizar uma junção de vários antígenos (Fischer et al., 2007). Atualmente existem 35 ensaios clínicos a decorrer sendo que 29 são de fase I e 6 de fase II e I/II (AVAC, 2015a).

A realização deste trabalho foi feita recorrendo a vários sites, artigos e livros. A pesquisa dos artigos foi feita em sites como PubMed, nature.com, entre outros. Outros sites utilizados foram, por exemplo, aids.gov, avert.org, cdc.gov, nih.gov, nhs.uk, niaid.nih.gov, e hvtn.org.

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

Parte I

O Vírus da Imunodeficiência Humana

I. A infecciosidade do VIH

1) A descoberta do VIH

Foi em 1959, há mais de 50 anos, que foi registada a primeira infeção, na República Democrática do Congo, pelo VIH-1 num humano. Pensa-se que VIH (tipo 1 e 2) seja o resultado de uma mutação do SIV (*Simian Immunodeficiency Virus*: Vírus da Imunodeficiência Símia) quando este foi transmitido ao Homem pelo seu contato com sangue infetado dos símios (The AIDS Institute, 2011; Mendes, 2000; AVERT, 2013). Com o passar dos anos, o vírus foi-se expandido pelo Mundo, e em 1981 foram descobertos vários casos de SIDA nos Estados Unidos em indivíduos homossexuais do sexo masculino (The AIDS Institute, 2011; Sabino & Saéz-Alquézar, 2000).

A sigla SIDA (Síndrome da Imunodeficiência Humana) começou a ser referenciada em 1982 pelas autoridades de saúde pública para mencionar casos de infeções oportunistas¹, em pessoas previamente saudáveis, como sarcoma de Kaposi, pneumonia causada por *Pneumocystis jirovecii* e vários cancros que eram resistentes aos tratamentos (The AIDS Institute, 2011; AVERT, 2013).

Passado um ano, em 1983, a SIDA foi identificada como sendo uma consequência da infeção pelo VIH (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; The AIDS Institute, 2011). Esta afirmação deve-se à descoberta de um vírus com atividade de transcriptase reversa que foi isolado de um linfonodo de um paciente com SIDA e de um paciente com linfadenopatia persistente. Também foi observado o mesmo agente em indivíduos assintomáticos (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000). Nesta altura, o vírus foi denominado de HTLV-III/LAV (Human T-cell Lymphotropic Virus-type III/Lymphadenopathy-associated Virus), sendo que hoje em dia a sua denominação é VIH (Human Immunodeficiency: Vírus da Imunodeficiência Humana) (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; The AIDS Institute, 2011). Existem dois tipos de VIH: VIH tipo 1 e tipo 2, sendo que o tipo 1 é o mais predominante e normalmente quando se refere a VIH, fala-se do VIH tipo 1. O VIH-2, descoberto em 1986 no oeste de África, tem algumas características diferentes do anterior e apresenta tanto uma menor infecciosidade como patogenicidade e normalmente encontra-se na África Ocidental (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; AVERT, 2014; AVERT, 2013).

¹ As doenças oportunistas são assim classificadas pois valem-se de um sistema imunitário fraco para causar uma doença, o que não aconteceria num indivíduo com sistema imunitário normal (AIDS, 2010b).

Foi igualmente em 1983 que foi relatado o primeiro caso de VIH em Portugal no Hospital Curry Cabral sendo que a sintomatologia do indivíduo indicava que já se encontrava na última fase da infeção do VIH, o que foi posteriormente confirmado por exames (Roche, 2014a).

Passados 29 anos, em 2012, o número total de infetados por VIH em Portugal era de 42580, sendo que nesse ano registaram-se 776 novos casos (Diniz et al., 2013). A tabela seguinte resume os novos casos por data de diagnóstico:

Tabela 1 - Número de infeções por VIH por data de diagnóstico em Portugal (1983 a 2012).
(Retirado de Diniz et al., 2013)

Ano	Nº casos / Data diagnóstico	Ano	Nº casos / Data diagnóstico
1983	3	1998	2647
1984	6	1999	2789
1985	42	2000	2795
1986	78	2001	2475
1987	157	2002	2393
1988	260	2003	2220
1989	372	2004	2147
1990	523	2005	1997
1991	661	2006	2046
1992	942	2007	1983
1993	1046	2008	1983
1994	1312	2009	1787
1995	1648	2010	1605
1996	2128	2011	1321
1997	2438	2012	776
		Total	42580

Analisando os valores obtidos, conclui-se que a partir de 2000 há uma diminuição moderada e progressiva de números de infetados sendo que desde 2006 a diminuição foi de 20% (Diniz et al., 2013; Público, 2013). Apesar disto, Portugal é o 3º país europeu com maior taxa de novos casos de SIDA (ou seja, indivíduo já apresenta pelo menos uma doença reveladora de um sistema imunitário deprimido), resultado de um diagnóstico tardio, com 31,8% dos infetados diagnosticados nesta fase (Público, 2013).

No mais recente estudo feito em Portugal - *30 anos, 30 Mitos do VIH/SIDA* – chegou-se à conclusão que, após 30 anos do primeiro diagnóstico ainda existem

dúvidas, na população, sobre a transmissão, prevenção, tratamento e diagnóstico (GAT, 2014).

As metas para 2016, lançadas pela Direção Geral da Saúde e pelo Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção VIH/SIDA, são seis e a saber (DGS, 2014):

“

- 1. Reduzir em Portugal o número de novas infeções por VIH em 25%;*
- 2. Diminuir de 65% para 35% os diagnósticos tardios de infeção pelo VIH (definidos pela contagem de linfócitos T CD4+ inferior a 350/mm³);*
- 3. Diminuir em 50% o número de novos casos de SIDA;*
- 4. Diminuir em 50% o número de mortes por SIDA;*
- 5. Aumentar para 95% a proporção dos indivíduos que dizem usar preservativo em relações sexuais ocasionais;*
- 6. Eliminar a transmissão da infeção por VIH da mãe para o filho. ”*

2) Transmissão

Os primeiros casos relatados de SIDA foram assistidos em hemotransfundidos, crianças cujas mães estavam infetadas, pessoas que tinham relações sexuais com sujeitos infetados e toxicodependentes (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000). Estes casos vêm a confirmar os mecanismos de transmissão conhecidos hoje em dia, que são: contacto dos fluídos corporais – sangue, sémen, secreções vaginais e retais – com a mucosa (reto, vagina, boca e glande); partilha de agulhas e seringas entre usuários de droga, bem como acidentes que envolvam a troca de fluídos corporais por parte dos profissionais de saúde; de mães para filhos; pela gestação, parto e amamentação. Devido ao avanço da tecnologia e dos novos testes de rastreio sanguíneo, a hemotransfusão e transplantes já não são um meio de transmissão preocupante (CDC, 2014b; Cichocki, 2010).

3) A infecção por VIH

O VIH é um vírus com tropismo para o sistema imunitário, infectando as células CD4 do hospedeiro, onde se replica, danificando e impossibilitando a célula de realizar as suas funções. Em consequência, quanto maior o número de células infetadas, mais fraco fica o sistema imunitário, logo, o indivíduo não se encontra tão protegido contra outras doenças ou infeções como uma pessoa saudável (Cichocki, 2009b).

A sintomatologia desta infecção varia com o estágio em que se encontra e de pessoa para pessoa, sendo que inicialmente a generalidade das pessoas podem permanecer assintomáticas, sentindo-se apenas doente quando a infecção começa a evoluir para SIDA. Desta forma, pode-se distinguir os seguintes estádios da infecção: início (infecção aguda), fase de latência e, por fim, SIDA (Sifris & Myhre, 2014; AIDS, 2013b).

Assim, a infecção primária do VIH (ARS, do inglês *Acute retroviral syndrome*: síndrome retroviral aguda) ocorre nas primeiras quatro semanas e os sintomas sentidos assemelham-se a um estado gripal: febre, prurido, glândulas inchadas, dores musculares, de cabeça e nas articulações. É de lembrar que nem sempre se desenvolve esta fase aguda e que os infetados podem entrar directamente na fase de latência e não apresentar qualquer sintoma por longos períodos de tempo. Apesar da possível ausência de sintomas, nesta fase há um grande número de vírus em circulação (carga viral² elevada) o que contribui para a propagação do VIH (Sifris & Myhre, 2014; CDC, 2014a). Contudo, para avaliar se de facto o indivíduo está infetado é necessário realizar testes serológicos para identificar a presença de anticorpos. Contudo como a infecção ainda está no início poderá não haver anticorpos suficientes (período de janela) para obter uma resposta fidedigna, o que pode levar a falsos negativos (Sifris & Myhre, 2014). O período de janela designa o tempo que ocorre desde a infecção até haver anticorpos suficientes para serem detetados numa pesquisa serológica. Assim, no caso de um primeiro resultado negativo e se tiver sido feito nos três meses seguintes à possível exposição, dever-se-á repetir a análise três meses depois. Esta nova análise é necessária porque, em raros casos, apenas após seis meses é que há anticorpos anti-VIH suficientes (Janssen-Cilag Farmacêutica, 2015). No entanto, em 2013 foi aprovado pela FDA

² A carga viral indica a quantidade de VIH ativo que existe numa pessoa infetada, sendo usada como parâmetro para avaliar se o tratamento está a ser eficaz e para saber quão ativo está o vírus. Assim, há uma relação direta entre o quão ativo o vírus é e o valor deste parâmetro sendo que o objetivo da terapia é manter a carga viral no mínimo através da supressão da replicação viral (Cichocki, 2007a).

(*Food and Drug Administration*) o primeiro teste serológico rápido que deteta tanto VIH-1 antígenos (p24) como VIH-1 e VIH-2 anticorpos (*Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo test*) (AIDS, 2013a; Alere, 2013). No fim desta fase, há um decréscimo na carga viral resultante da ação do sistema imunitário, acompanhado pelo desaparecimento dos sintomas (Roche, 2014b).

Numa segunda fase há uma latência clínica caracterizada por ser um período assintomático, apesar do vírus se encontrar no hospedeiro e estar a ocorrer uma replicação ativa (mas a um ritmo muito baixo). Esta latência mantém-se geralmente durante dez anos, podendo no entanto variar significativamente, e é possível que um indivíduo se mantenha nesta fase recorrendo à medicação antirretroviral que auxilia no controlo do vírus. Apesar de estarem assintomáticos isso não significa que não transmitam o vírus mas se tiver em tratamento farmacológico o risco de transmissão é menor, uma vez que a carga viral também é menor. O fim desta fase é caracterizado por um aumento da carga viral e uma diminuição das células CD4, levando ao enfraquecimento do sistema imunitário (AIDS, 2013b; CDC, 2014a).

A última fase dá-se quando se atinge o estágio de SIDA. Nesta altura o sistema imunitário já se encontra bastante vulnerável a doenças oportunistas (infecções e cancro) e há alguns sintomas que podem indicar a evolução para esta etapa, entre eles: febres e suores noturnos, pneumonia, brusca perda de peso e cansaço extremo e incompreensível (CDC, 2014a; AIDS, 2013b).

Pode-se caracterizar a SIDA por duas diferentes vias (em adição à presença do VIH): uma em que os níveis dos CD4 é inferior a 200 células/mm³ (200 células por milímetro cúbico) de sangue; a segunda, em que não se tem em conta a quantidade das células CD4 mas sim se desenvolveu doenças oportunistas³ que abrangem as doenças pulmonares, neurológicas e gastrointestinais (AIDS, 2013b; CDC, 2014a; Sifris & Myhre, 2014). A esperança média de vida para uma pessoa com SIDA e sem tratamento é de apenas 3 anos e diminui se contrair alguma doença oportunista (CDC, 2014a). Por outro lado, quem toma anti-retrovirais pode não seguir a evolução descrita e até nunca atingir uma fase sintomática da doença (Roche, 2014b).

³ De acordo com a CDC (*Centers of Disease Control and Prevention*) há 20 doenças que se podem encarar como sendo uma condição para a definição de SIDA. Entre essas doenças estão: candidíase da traqueia, esófago, brônquios ou pulmões; criptococoses; infeção por citomegalovírus; sarcoma de Kaposi; pneumonias recorrentes (AIDS, 2010b).

4) Distinguir VIH seropositivo e SIDA

Conforme supracitado a evolução para SIDA dá-se quando não se faz o tratamento farmacológico, sendo que quando se faz o tratamento esta evolução encontra-se retardada e até poderá não acontecer. Outra consideração é que não é o vírus em si a causa da doença mas é devido à sua ação no sistema imunitário que leva à evolução para SIDA. Desta forma, a evolução está depende de vários fatores como alimentação, saúde e se está em tratamento farmacológico. A infeção pelo VIH ainda não tem tratamento mas as doenças associadas ao vírus tanto se podem tratar como prevenir (Cichocki, 2007b).

A diferença entre ser seropositivo para o VIH e ter SIDA é que a SIDA é uma consequência da infeção pelo vírus da imunodeficiência humana, portanto não pode haver SIDA sem VIH mas nem sempre a infeção viral evolui até ao último estágio (tabela 2) (San Francisco AIDS Foundation, 2014b).

Tabela 2 - Números de casos de infeção por VIH em Portugal, por ano de diagnóstico e por estágio, de 1983 a 2012. (Retirado de Diniz et al., 2013)

Infeção por VIH em Portugal				
Ano	Portador Assintomático	Portador Sintomático (Não Sida)	SIDA	Total
≤2002	11265	2361	11089	24715
2003	1038	203	979	2220
2004	1059	218	870	2147
2005	984	171	842	1997
2006	1084	230	732	2046
2007	1091	262	630	1983
2008	1130	243	610	1983
2009	1075	227	485	1787
2010	907	202	496	1605
2011	738	190	393	1321
2012	391	138	247	776
Total	20762	4445	17373	42580

Como já referido, um dos parâmetros para averiguar o progresso para SIDA é o número de células CD4 pois são estas que são o alvo do vírus. Estas células vão diminuindo em quantidade ao longo da progressão da infeção pois, o organismo já não consegue produzir tantas células quanto aquelas que foram destruídas pelo vírus. Com isto há uma diminuição progressiva de células CD4 funcionais, comprometendo o sistema imunitário e o indivíduo fica mais propenso a doenças e infeções (Cichocki, 2007c). Numa pessoa saudável o número de células CD4 está compreendido entre

500cel/mm³ a 1000cel/mm³ e, por isso, se a contagem estiver neste intervalo não se inicia o tratamento. A terapia começa quando as células estão inferior a 350cel/mm³, visto que a partir desta quantidade o organismo torna-se suscetível a vários tipos de infecções oportunistas, e principalmente se a carga viral for elevada (AIDSPortugal, 2002; AIDS, 2010a; Campos & Freitas, 2013). Em Portugal, está regulamentado que se deve ponderar iniciar o tratamento com a contagem das CD4 acima das 350 se for diagnosticada uma enfermidade relacionada com o VIH, hepatite B ou C, coinfeção pela Tuberculose ou para reduzir o risco de transmissão sexual do VIH (Campos & Freitas, 2013). Quando o número das células é inferior a 200cel/mm³ já se diagnostica como SIDA e estas contagens devem ser realizadas de 3 a 6 meses (AIDS, 2010a). Após iniciar o tratamento a quantificação da carga viral também deve ser feita com a mesma periodicidade para garantir que a medicação continua a funcionar e que não há indícios de resistência aos fármacos (WebMD, 2014).

II. Características do vírus

1) Classificação do vírus

O VIH pertence à família *Retroviridae*, sendo um retrovírus, isto é, um vírus de RNA (ribonucleic acid: ácido ribonucleico) que utiliza a enzima transcriptase reversa (RT) para transformar o seu genoma numa dupla cadeia de DNA (desoxiribonucleic acid: ácido desoxiribonucleico), permitindo a sua incorporação no genoma da célula hospedeira (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Sifris & Myhre, 2013b; Roche, 2014c; Pereira & Tavares, 2002). A integração do genoma viral na célula hospedeira faz com que esta o leia como se fosse o seu genoma, permitindo, assim, a replicação do vírus e, consequentemente, a produção de novos vírus que irão infetar novas células hospedeiras (Sifris & Myhre, 2013b; Roche, 2014c).

Os retrovírus são classificados em diferentes géneros consoante a homologia na sequência dos aminoácidos da RT. Desta forma, há sete géneros e o VIH encontra-se no género dos *Lentivirus* (VIH-1 e VIH-2) (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Pereira & Tavares, 2002). A denominação *Lentivirus* significa vírus lento e é devido ao facto dos sintomas demorarem tempo até serem notados, o que faz com que haja um grande período assintomático (AVERT, 2013; Pereira & Tavares, 2002).

Das duas estirpes do VIH, o VIH-1 é a estirpe mais virulenta, infecciosa e predominante no Mundo e tanto tem semelhanças como diferenças com VIH-2 (The AIDS Institute, 2011; Cichocki, 2007d; Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Shah, 2012). Nas semelhanças destacam-se os mecanismos de transmissão, a sujeição a doenças oportunistas, a medicação antirretroviral e o teste para a monitorização dos níveis dos CD4. Por outro lado, estes distinguem-se pelo facto do VIH-2 ter o seu pico infeccioso mais tarde do que o VIH-1 e como tal as pessoas infetadas com VIH-2 são menos infecciosas no início da doença do que as infetadas com VIH-1; o VIH-1 enfraquece o sistema imunitário mais rapidamente que a outra estirpe; as diferentes estirpes aparecem em diferentes partes do Mundo (Cichocki, 2007d).

Dentro do tipo 1 podem-se distinguir diferentes grupos: grupo M (*Major*), grupo O (*Outlier*), grupo N (não são M ou O) e ainda o grupo P (AVERT, 2014; Shah, 2012). É VIH-1 do grupo M que causa a maioria das infeções e, atualmente este grupo tem ainda subtipos classificados de A a K e os CFRs (do inglês *circulating recombinant*

form: forma recombinante circulante). Os CFRs resultam da mistura de dois tipos de VIH que infetam a mesma célula, originando um novo vírus híbrido (AVERT, 2014). Relativamente aos subtipos, a sua distribuição pelo Mundo é heterogénea sendo que na Europa o mais predominante é o subtipo B (Shah, 2012). É importante saber o subtipo do vírus que causa a infeção, pois, de acordo com alguns estudos realizados, a progressão da doença é influenciada pelo subtipo viral. Por exemplo, pessoas “*infetadas com o subtipo D ou uma estirpe recombinante contendo o subtipo D atingem mais cedo o estado de SIDA do que os infetados com subtipo A, e morrem mais cedo se não receberem tratamento antirretroviral.*”. Esta alta virulência do subtipo D está associada à sua “*maior eficácia em se ligar às células imunitárias*” (AVERT, 2014).

Estas características específicas de cada subtipo aliadas à variação genética da população que precisa de proteção fazem com que o desenvolvimento da vacina esteja dificultado. Assim, mesmo que se consiga desenvolver uma vacina, não significa que a reposta imune desencadeada pela vacinação previna a infeção pelos diferentes subtipos do vírus. A eficácia da vacina encontra-se, igualmente, posta à prova devido ao facto de haver uma prevalência viral diferente nos diversos países, a menos que se consiga desenvolver uma vacina que abranja diferentes estirpes (AVERT, 2014).

2) *Morfologia*

O VIH (ilustração 1) tem cerca de 100 nm de diâmetro, é envolvido por um invólucro lipídico, proveniente da membrana citoplasmática da célula que o originou, que apresenta duas glicoproteínas virais. As glicoproteínas são a gp41 (transmembranar), a gp120 (superfície) e são elas que auxiliam a invasão do vírus na célula hospedeira pois ligam-se a recetores membranares específicos desta (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Pereira & Tavares, 2002; Shah, 2012). Em resposta à invasão, os anticorpos neutralizantes

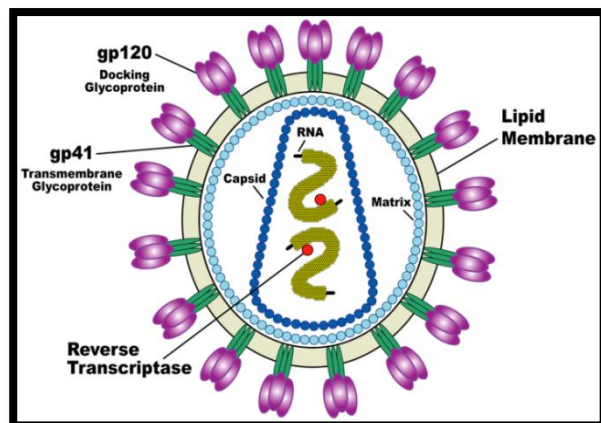


Ilustração 1 - Representação da estrutura do VIH. Nesta imagem encontra-se representado a roxo as proteínas gp120; a verde as proteínas gp40; a azul-escuro a cápside; a azul-claro a matrix; a vermelho a enzima transcriptase reversa; e a verde-azeitona o RNA. (Retirado de NIH, 2004).

produzidos são dirigidos à gp120, pois esta possui uma região imunodominante que é o epítopo V3 (epítopo variável) (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000).

Internamente ao invólucro encontra-se a matriz que é uma estrutura proteica composta pela proteína p17. Esta matriz envolve o core, que é constituído por proteínas p24, onde se encontram as duas cadeias simples RNA viral e as enzimas transcriptase reversa, integrase e protease (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Shah, 2012). A presença destas enzimas é indispensável para que ocorra o ciclo replicativo do VIH, visto que a célula hospedeira não as produz (Pereira & Tavares, 2002).

O RNA do VIH compreende nove genes e duas regiões terminais LTR (Long Terminal Repeats); as regiões LTR são importantes pois é onde se encontram os elementos necessários ao controle da integração, transcrição e poliadenilação dos RNA_m, regulando assim a expressão dos provírus; os genes podem-se agrupar em dois grupos (tabela 3): os que codificam as proteínas estruturais e enzimáticas – *gag*, *pol*, *env* – e os que codificam proteínas não-estruturais – *tat*, *rev*, *nef*, *vif*, *vpu* e *vpr*.

Assim, o gene *gag* (antigénio de grupo) codifica as proteínas da matriz (p17 ou MA), do core (p24 ou CA) e as nucleares (NC ou p6 e p7). Já o gene *pol* (polimerase) codifica as enzimas virais: transcriptase reversa (RT ou p51/p66), protease (PR ou p10) e integrase (IN ou p32). Por sua vez, o gene *env* (invólucro) codifica as glicoproteínas presentes no invólucro (gp41 ou TM e gp120 ou SU) (Pereira & Tavares, 2002; Sabino & Saéz-Alquézar, 2000). Estes genes apresentam-se sempre pela mesma ordem em todos os retrovírus sendo a seguinte: 5’-*gag-pol-env*-3’ (ilustrações 2 e 3) (Pereira & Tavares, 2002).

Os genes não estruturais podem ainda ser divididos em duas classes: os regulatórios que são fundamentais para a replicação viral – *tat* e *rev* –; e os acessórios – *vif*, *vpu*, *vpr* e *nef* (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000). Apesar da denominação de “acessórios”, as proteínas destes genes desempenham igualmente um papel importante na replicação viral (Tabela 4) (Nomaguchi et al., 2012).

As regiões LTR englobam três zonas funcionais – U3, R e U5, sendo que a U3 tem uma sequência promotora e um *enhancer* (intensificador) (Pereira & Tavares, 2002).

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

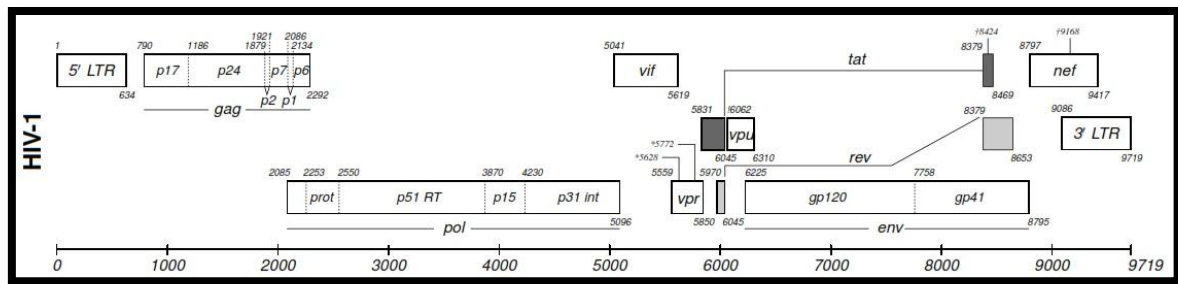


Ilustração 2 - Organização esquemática do genoma do VIH-1. Da esquerda para a direita encontram-se representados, respetivamente, o gene gag, gene pol, gene env. Os genes não estruturais também estão representados: tat e rev, de cima para baixo, respetivamente. (Retirado de LANSLLC, 2006).

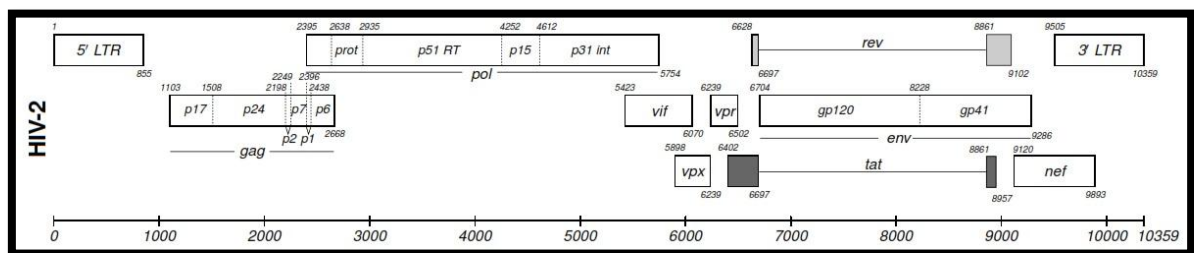


Ilustração 3 - Organização esquemática do genoma do VIH-2. Da esquerda para a direita encontram-se representados, respetivamente, o gene gag, gene pol, gene env. (Retirado de LANSLLC, 2006)

Tabela 3 - Resumo esquemático das proteínas virais. (Adaptado de Pal et al., 2013)

Classe	Gene	Produto proteico primário	Produto proteico processado
Proteínas estruturais	<i>Gag</i>	Poliproteína Gag	MA, CA, SP1, NC, SP2, P6
	<i>Pol</i>	Poliproteína Pol	RT, Rnase H, IN, PR
	<i>Env</i>	gp160	gp120, gp41
Proteínas regulatórias	<i>Tat</i>	Tat	
Proteínas acessórias	<i>Ver</i>	Ver	
	<i>Nef</i>	Nef	
	<i>Vpr</i>	Vpr	
	<i>Vif</i>	Vif	
	<i>Vpu</i>	Vpu	

Tabela 4 - Principais implicações das proteínas acessórias na replicação viral. (Adaptado de Nomaguchi et al., 2012)

Proteínas Virais	Principais funções na replicação viral
Vif	Necessária para a replicação nas principais células alvo. Neutraliza a proteína APOBEC3G/F que inibe a replicação do vírus nas células mencionadas (Sheehy et al., 2002).
Vpr	Importante para a replicação em macrófagos (VIH-1) (Nomaguchi et al., 2012).
Vpu	Necessária para a replicação em células CD4+. Antagoniza a proteína Tetherin que restringe a infecção pelo vírus (Neil et al., 2008).
Vpx	Essencial à replicação virica nas células alvo. Degrada a proteína SAMHD1 que bloqueia a replicação do VIH nas células dendríticas, monócitos e macrófagos (Nomaguchi et al., 2012); degrada a enzima com efeitos antivirais APOBEC3A (Berger et al., 2011).
Nef	Diminui o limiar da ativação dos linfócitos CD4+, fazendo com que mais sejam ativos, aumentando a população de células para infectar (Nomaguchi et al., 2012).

3) Ciclo de vida

O principal alvo deste vírus é o sistema imunológico, que é o responsável pela proteção do organismo, sendo que as células hospedeiras são, predominantemente, os linfócitos T-helper (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Roche, 2014c; BBC, 2014; Sifris & Myhre, 2013b).

O VIH necessita destas células hospedeiras pois necessita da “maquinaria da célula humana na criação de novos vírus”, incluindo a conversão do seu RNA em DNA, posteriormente incorporado no DNA da célula hospedeira (Roche, 2014c; Sifris & Myhre, 2013b).

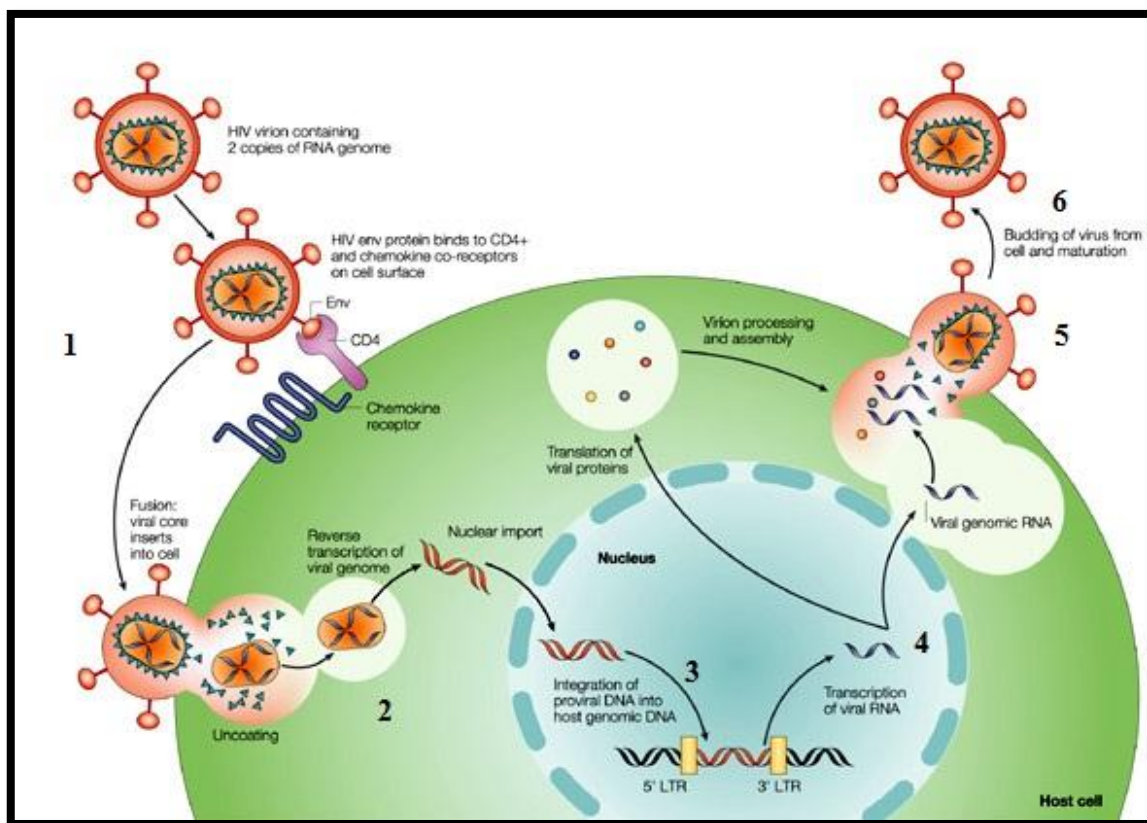


Ilustração 4 - Esquema do ciclo viral do VIH. Encontram-se representados as seis fases compreendidas: 1 - Ligação e entrada do vírus na célula; 2 – Transcrição reversa do RNA vírico; 3 – Integração do DNA viral; 4 – Replicação vírica (formação do novo vírus); 5- Desenvolvimento dos novos vírus; e 6 – Maturação desses novos vírus. (Retirado de Rambaut et al., 2004)

O ciclo viral do VIH pode-se compreender em 6 fases (ilustração 4): ligação e entrada do vírus na célula; transcrição reversa do material genético do vírus; integração do DNA viral; replicação vírica; desenvolvimento e maturação vírica (Roche, 2014c).

O ciclo viral inicia-se com a penetração do vírus na célula hospedeira. Esta entrada é auxiliada pela ligação entre a proteína de superfície viral gp 120 e o recetor da célula (molécula CD4). Esta ligação entre a proteína de envólucro do vírus com a célula, mediada pela gp 41, possibilita a fusão das membranas celulares dos intervenientes (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Roche, 2014c). Contudo, para que esta fase ocorra é ainda necessário a existência de coreceptores. Esta descoberta deve-se à observação de células propensas à infeção sem apresentar a molécula CD4. Os coreceptores são o CXCR-4 e CCR-5 existentes na membrana celular que são quimiocinas (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Stefani et al., 1998). Desta forma, o vírus entra no citoplasma da célula, onde perde a sua cápside por destruição enzimática (descapsidação), libertando o material genético (Pereira & Tavares, 2002).

A seguir à entrada na célula, para que o material genético do vírus se integre no da célula, ocorre a transcrição reversa do RNA viral em DNA. Este processo ocorre nas primeiras seis horas da infecção e é realizado pelas enzimas transcriptase reversa e ribonuclease H no citoplasma celular (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Roche, 2014c). Assim, há, inicialmente, a formação de uma cadeia simples de DNA de sentido negativo que vai ser o modelo para a síntese da cadeia de polaridade positiva, formando um DNA de cadeia dupla (Pereira & Tavares, 2002).

A terceira fase inicia-se depois da transcrição sendo que, com o auxílio da enzima integrase, o DNA viral migra para o núcleo da célula hospedeira. Este DNA, orientado pela integrase e pelas regiões LTR, insere-se aleatoriamente no DNA hospedeiro (formando um pro-vírus) e fica na célula enquanto esta for viva. Desta forma o vírus utiliza a maquinaria da célula hospedeira, havendo a síntese do RNAm viral pela RNA polimerase II, que migra para o citoplasma. Este RNAm vai ser traduzido em proteínas víricas, sendo que as primeiras proteínas a serem sintetizadas são as que regulam a transcrição: tat, rev e nef (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Roche, 2014c; Pereira & Tavares, 2002). As proteínas tat e rev são necessárias, além da maquinaria da célula, para que haja uma expressão eficiente do DNA proviral, isto porque as células infetadas sintetizam poucas quantias de RNA (Pereira & Tavares, 2002). De seguida são sintetizadas proteínas estruturais (centrais e do invólucro). As proteínas centrais são sintetizadas na forma de uma molécula multi-proteína que irá ser fragmentada durante a maturação. As proteínas são conduzidas para a membrana celular juntamente com RNA viral para que se possa haver a formação da nova partícula vírica (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Roche, 2014c).

A formação de novos vírus é um processo evolutivo que depende do desenvolvimento e maturação do vírus e começa pela gemulação dos vírus imaturos que entram na corrente sanguínea. Assim, após todos os elementos víricos se juntarem na membrana da célula e formarem uma vesícula, deixam a célula carregando todas as proteínas víricas e RNA requerido para a formação dos viriões. Os viriões ao entrarem na corrente sanguínea encontram-se imaturos e incapazes de infetar novas células. É necessário que ocorra a maturação para que a partícula viral se torne madura e infecciosa.

A maturação consiste no processamento das proteínas centrais do vírus pela enzima protease, que ao ficarem livres, formam as estruturas maduras do vírus. O vírus é agora maduro e infeccioso (Sabino & Saéz-Alquézar, 2000; Roche, 2014c).

Durante o processo, as células CD4 morrem (ilustração 5) devido à infecção pelo VIH, levando a uma diminuição de células no sistema imunológico e, consequentemente, uma possível imunodeficiência profunda (BBC, 2014; Roche, 2014c).

A morte destas células pode ocorrer de duas formas: ativação da caspase-3 e apoptose; ou ativação da caspase-1 e piroptose. A ativação da caspase-3 e apoptose só acontece numa pequena porção das células: nas células onde o vírus se encontra produtivo, ou seja, está em replicação (Doitsh et al., 2014).

Efetivamente, na generalidade dos casos (95%) as células morrem pelo segundo mecanismo supramencionado, denominado morte por infecção abortiva (Doitsh et al., 2014; Skwarecki, 2013). Este mecanismo

acontece nas células onde há VIH mas este não se replica devido à presença de moléculas inibidoras, presentes no hospedeiro, comprometendo a ação da transcriptase reversa (RT) (Doitsh et al., 2010). Este modo de morte celular provoca a rutura celular e libertação do conteúdo intracelular e de IL-1b, ocorrendo inflamação nesses tecidos o que atrai novas células T CD4+, provando uma inflamação crónica e maior depleção destas células (Doitsh et al., 2014; Skwarecki, 2013). Neste caso, a caspase-1 não é induzida pelo NLRP3 (Doitsh et al., 2014) mas sim pelo IFI16 ao reconhecer a genética viral (Monroe et al., 2014).

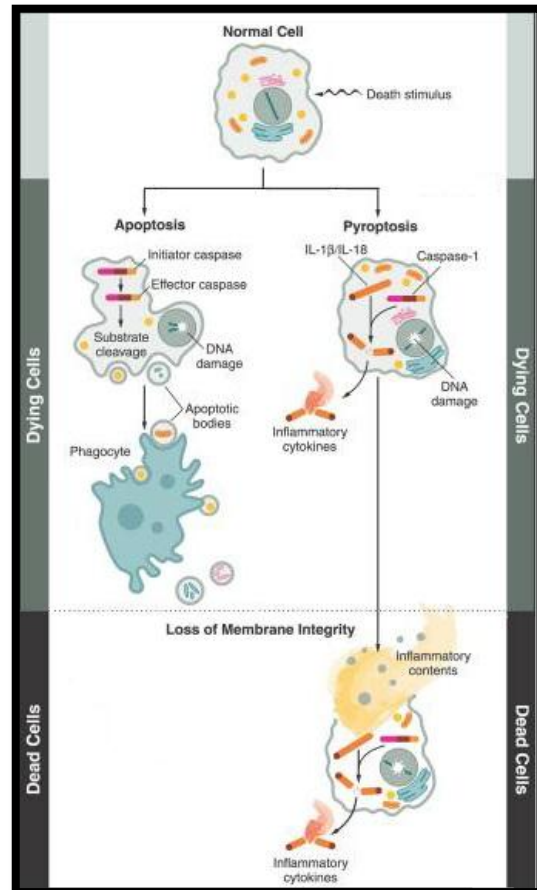


Ilustração 5 - Esquema representativo das diferenças entre a morte por apoptose e piroptose. Permite identificar os diferentes compostos moleculares ativados e necessários para que haja morte celular. (Adaptado de Fink & Cookson, 2005).

4) Variabilidade genética

A variabilidade genética do VIH é resultante das mutações sofridas durante o processo de replicação. Estas mutações são resultantes da ação da transcriptase reversa que adiciona erroneamente bases no genoma viral, e uma vez que a RT não tem a capacidade de correção de erros de leitura estes erros não são emendados, permanecendo no DNA proviral. Devido ao elevado número de mutações, há formação de populações geneticamente heterogéneas que são denominadas de *quasispecie* (Pereira & Tavares, 2002; Sabino & Saéz-Alquézar, 2000).

Estas mutações ocorrem principalmente nas regiões hipervariáveis do gene *env* sendo que são estas as zonas mais visíveis ao sistema imunitário do hospedeiro. Como os anticorpos produzidos pelo hospedeiro são dirigidos às regiões hipervariáveis das glicoproteínas de envólucro, o facto de haver mutações nesses locais representa uma possibilidade de fuga à neutralização imunológica (Pereira & Tavares, 2002).

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

Parte II

O desenvolvimento da vacina

I. Necessidade da vacina

1) Epidemiologia do VIH

Os últimos dados recolhidos em 2013 revelam que há cerca de 35 milhões de pessoas infetadas com o vírus da imunodeficiência humana (UNAIDS, 2013a), ocorriam 5700 novas infeções por dia (Wang et al., 2015) e milhão e meio de pessoas faleceram, durante esse ano, de doenças associadas a esta infeção (WHO, 2014a). Em 2012 a infeção por VIH foi considerada a sexta causa de morte mundialmente (WHO, 2014b).

2) Porquê uma vacina?

Com o objetivo de controlar a infeção surgiu a necessidade de desenvolver uma vacina, apesar da medicação disponível nem todos têm acesso a estes fármacos e, com o seu uso recorrente, os vírus podem desenvolver habituação aos fármacos e há a necessidade de os alterar. Mas principalmente porque, com o aumento de novas infeções e com a carência em fazer chegar tratamento a todos que precisam, é melhor apostar na prevenção do que no tratamento farmacológico que apresenta muitos efeitos secundários. De igual modo, os custos monetários também influenciam, isto porque como é um tratamento crónico acaba por se tornar muito dispendioso (Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015c). Apesar de já haver disponível nos Estados Unidos da América e estar em estudo a sua entrada para os mercados europeus (Cairns, 2014a), o uso de PrEP (do inglês Pre-Exposure Prophylaxis, em português profilaxia de pre-exposição) apresenta os mesmos senãos da terapia oral: pouca acessibilidade, efeitos secundários e custo monetário (Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015c). Assim sendo, as vacinas aparecem como uma alternativa económica, efectiva e prática para tentar prevenir a infeção (Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015c; Girard et al., 2006) e controlar a pandemia (Girard et al., 2006; Wang et al., 2015).

3) Importância da vacina para o VIH

Visto que a melhor forma para terminar com uma doença é a erradicação do agente causador, é com esse objetivo que se tem tentado desenvolver a vacina contra o

VIH. Contudo, devido às dificuldades sentidas, os cientistas têm tentado obter uma cura funcional em vez da eliminação total do vírus (Boskey, 2012).

A cura funcional baseia-se na eliminação do vírus na corrente sanguínea e na supressão dos efeitos negativos do VIH no organismo. Dito isto, a grande diferença entre a cura funcional e a erradicação é que na primeira não há a necessidade de ter a preocupação que o vírus seja eliminado do reservatório viral. Desta forma, tem-se que garantir que os níveis virais no sangue são indetectáveis e que o Sistema Imune (S.I) funciona em pleno.

Apesar das características da cura funcional serem alcançadas, até certo ponto, pela terapia oral, com a vacina os doentes poderiam melhorar os seus resultados sem a toma regular da medicação e, consequentemente, sem os seus efeitos secundários (Boskey, 2012).

O desenvolvimento de uma vacina para o VIH que se demonstre segura e efectiva é o passo fulcral para que se chegue à meta de não haver novas infeções por este vírus (UNAIDS, 2013b).

A vacinação é igualmente importante por ser uma doença transmitida pessoa a pessoa e, por isso, deve-se atingir a imunidade de grupo. A teoria da imunidade de grupo (ilustração 6) sugere que quando uma parte da população se encontra imunizada ou menos susceptível à doença, há menor a probabilidade de indivíduo susceptível entrar em contacto com uma pessoa infetada e, consequentemente, menor probabilidade de haver um surto da doença. Desta forma, a propagação da doença está controlada, protegendo também os indivíduos que não podem tomar a vacina (exemplos: crianças e

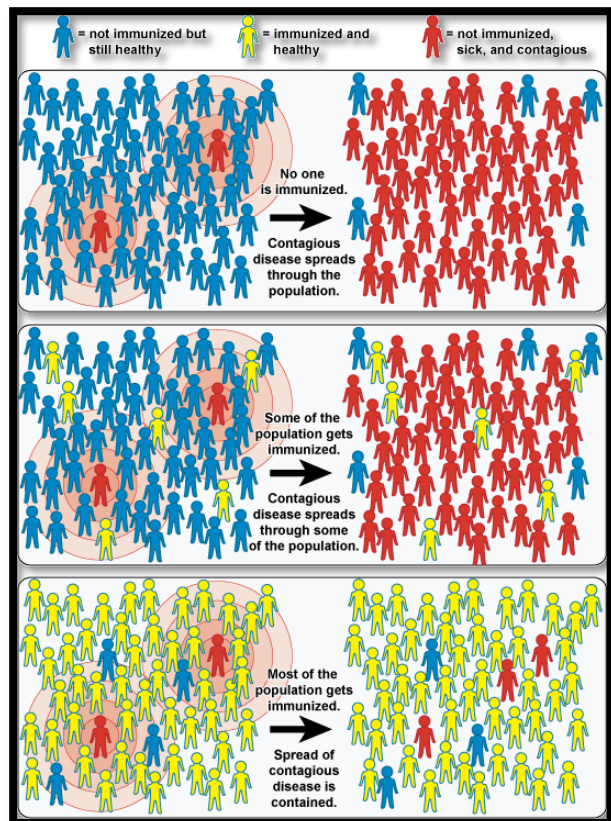


Ilustração 6 - Esquema representativo da imunidade de grupo. O azul representa indivíduos saudáveis mas não imunizados; o amarelo os indivíduos saudáveis e imunizados; e a vermelho os indivíduos doentes, não imunizados e contagiosos. (Retirado de NIAID 2010).

grávidas) (NIAID, 2010; Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015a). Para manter a doença controlada é importante que a imunidade de grupo se mantenha (Immunisation Advisory Centre, 2012).

Para saber quão contagiosa uma doença é pode-se recorrer ao termo matemático R_0 (R nought), que indica o número de pessoas que vão ser infetadas por uma pessoa infetada (Ramirez, 2014). De acordo com o trabalho de Tomás Aragón e Arthur Reingold, o R_0 para o VIH situa-se entre dois e cinco, sendo que para R_0 perto de 5 é necessário vacinar, pelo menos, 82% da população para prevenir uma epidemia (Aragón & Reingold, 2011). Segundo a pesquisa de Vanessa Ramirez (ilustração 7) o R_0 para o VIH situa-se nos 4 (Ramirez, 2014).

A proporção de pessoas vacinadas que se encontram protegidas pela toma da vacina obtém-se pelo cálculo da eficácia da vacina, isto é, através da comparação do número de doentes entre os que levaram a vacina e os não-vacinados (Immunisation Advisory Centre, 2012).

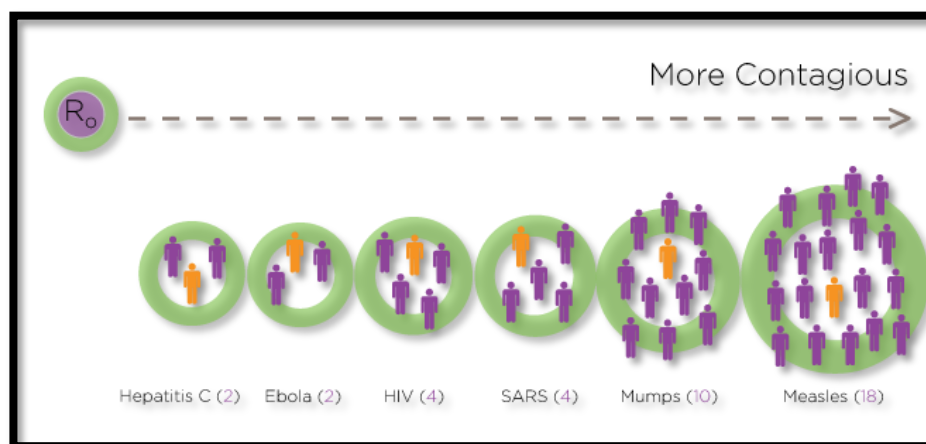


Ilustração 7 - Esquema representativo de vários valores de R_0 nought. Quanto maior o R_0 nought, mais contagiosa é a infeção. Da esquerda para a direita encontra-se, respetivamente, Hepatite C com R_0 de 2; Ébola com R_0 de 2; VIH com R_0 de 4; SARS com R_0 de 4; Papeira com R_0 de 10; e Sarampo com R_0 de 18. (Retirado de Ramirez 2014)

II. Estratégias para a pesquisa de vacinas

Há diferentes tipos de vacinas e cada uma implica uma técnica de desenvolvimento específica (The College of Physicians of Philadelphia, 2014a; U.S. Department of Health and Human Services, 2013), além de estimularem o Sistema Imunológico de formas distintas, fazendo com que a dimensão da resposta imunológica varie (Immunisation Advisory Centre, 2011). Esta resposta varia também, dependendo da concentração de antígeno, tipo de antígeno, do tipo de adjuvante e da via de administração (Immunisation Advisory Centre, 2011).

1) Vacinas Preventivas e Terapêuticas

Independentemente do tipo de vacina, o grande objetivo da vacinação é “ensinar” ao Sistema Imunitário a reconhecer o patógeno e eliminá-lo. Tendo em conta esta finalidade pode-se denominar outros dois tipos de vacinas: vacinas terapêuticas e vacinas preventivas. Como tal, se a vacina tiver a finalidade de eliminar o patógeno já existente no organismo, ou seja, a pessoa já se encontra infetada, esta designa-se terapêutica. Se a finalidade da vacinação for a prevenção de uma possível infeção é designada vacina preventiva (Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015b; Cichocki, 2008). Assim, neste caso específico significa que as primeiras tem como objetivo deter a multiplicação do VIH, logo, retardando a evolução para SIDA bem como tornar essa pessoa menos infecciosa. Já o segundo tipo de vacinas tem o objetivo evitar os danos de uma infeção através da instrução do Sistema Imunitário a reconhecer o VIH como patogénico e, quando em contacto com este, desencadear uma resposta rápida de controlo da infeção (Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015a).

2) Vacinas Vivas e Inativadas

Da forma como são elaboradas, globalmente há dois tipos de vacinas (ilustração 8): vacinas vivas atenuadas e vacinas inativadas, com características diferentes e que determinam o uso da vacina (Immunisation Advisory Centre, 2011). Da mesma forma apresentam diferentes vantagens entre si, enquanto as primeiras provocam uma forte resposta pela parte do Sistema Imune e podem conferir imunidade ao longo da vida, as segundas desencadeiam um estímulo mais fraco pelo que será necessário mais doses

para manter a imunidade. Por outro lado, as vacinas vivas atenuadas têm desvantagens que as outras não apresentam nomeadamente, as condições de preservação são mais rígidas (normalmente é requerido que se mantenham refrigeradas), e a possibilidade, apesar de remota, do micróbio atenuado se modificar para uma forma virulenta (U.S. Department of Health and Human Services, 2013). Outra diferença é a dose requerida sendo que nas vacinas vivas é necessário uma quantidade menor visto que, o microorganismo se vai replicar desencadeando uma resposta imunológica, já com as inativas é administrada a dose inteira do antigénio, sendo que a primeira dose (*prime-boost*) vai “preparar” o sistema imunológico e apenas nas doses subsequentes é que se desenvolve uma resposta imune protectora (Immunisation Advisory Centre, 2011).

Desta forma podem se distinguir os seguintes tipos de vacinas (U.S. Department of Health and Human Services, 2013):

- Vacina atenuada (contém o microorganismo vivo numa forma enfraquecida),
- Vacina inativada inteira (contém o microorganismo morto);
- Vacinas sub-unitárias (contêm os antigénios que estimulam de forma mais eficaz o Sistema Imune ou epítomos⁴);
- Vacina conjugada (conjugam-se antigénios do microorganismo com transportadores proteicos (Goldblatt, 2000));
- Vacinas de DNA (contém o DNA dos genes que codificam os antigénios do microorganismo);
- Vacinas recombinantes (contém o DNA do microorganismo, estando este inserido dentro de um vetor).

⁴ Os epítomos correspondem à parte do antigénio que é reconhecida pelo Sistema Imune, ou seja, a parte à qual se ligam as células T ou anticorpo. (U.S. Department of Health and Human Services, 2013)

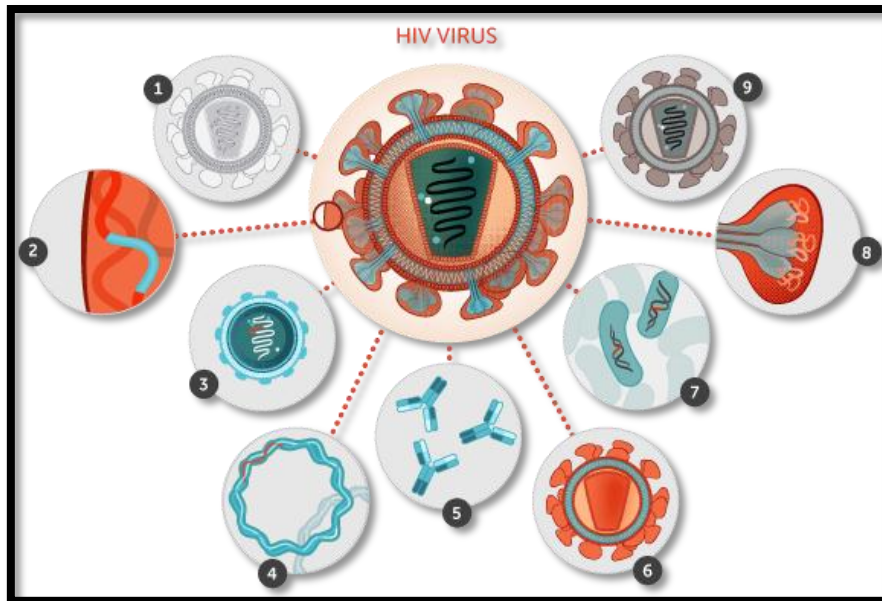


Ilustração 8 - Esquema dos tipos de vacinas. 1) Inativas; 2) Péptidos sintéticos; 3) Vetor recombinante; 4) DNA; 5) Anticorpos altamente neutralizantes; 6) Partículas vírus-like; 7) Vetor recombinante bacteriano; 8) Sub-unitárias; 9) VIH atenuado. (Retirado de Fred Hutchinson Cancer Research Center 2015b)

Recentemente, no desenvolvimento de vacinas contra o VIH os cientistas têm se concentrado nesta última – vacinas recombinantes com vetor. Como já mencionado, estas vacinas necessitam de um vetor – que poderá ser um vírus ou bactéria atenuado – que vai “carregar” o DNA do agente patogénico para o interior das células do indivíduo. Este género de vacinas copia o processo de uma infeção natural tendo como consequência uma boa estimulação do Sistema Imunitário (U.S. Department of Health and Human Services, 2013).

Até hoje, apesar da extensa pesquisa, ainda nenhuma vacina foi desenvolvida com sucesso seja ela preventiva ou terapêutica (Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015b).

A tabela a baixo representa os tipos de vacinas experimentados para desenvolver a vacina do VIH, bem como alguns problemas associados (NIH, 2012):

Tabela 5 - Estratégias para o desenvolvimento da vacina para o VIH. (Retirado de NIH, 2012)

Constituição da Vacina	Ação da Vacina	Complicações
DNA	<ul style="list-style-type: none"> - Alguns genes do VIH são inseridos em plasmídeos; - A vacina é injetada no músculo, onde os genes do vírus são expressados em proteínas; - As proteínas são processadas e apresentadas na superfície da célula, fazendo com as células T as reconheça, gerando uma resposta imunológica. 	A FDA ainda não aprovou nenhuma vacina deste género para uso em humanos.
Vetores	<ul style="list-style-type: none"> - Os genes do VIH/SIV são inseridos no genoma de um vetor (vírus ou bactéria) que não cause doença; - Quando estes vetores transferem o seu material genético para célula hospedeira, os genes do VIH/SIV também vão; - As proteínas víricas podem ser secretadas ou apresentadas na superfície da célula e apresentada ao S.I 	Apenas alguns vetores bacterianos se podem usar em modelos animais pequenos e grandes, e em ensaios de fase I.
Proteínas Virais	<ul style="list-style-type: none"> - Partes de péptidos ou proteínas sintetizadas quimicamente que induzem forte resposta pelas células T e B. 	Necessitam de um adjuvante que aumente a imunogenicidade.
Partículas tipo vírus	<ul style="list-style-type: none"> - Partículas semelhantes ao vírus que contêm proteínas do invólucro: mimetizam a estrutura externa do vírus. - As partículas assemelham-se ao vírus e induzem mais anticorpos de proteção. 	Até agora tem sido difícil fazê-los de forma reprodutível.

3) Adjuvantes

De acordo com a informação disponibilizada pela VIH Vaccine Trials Network (HVTN), algumas vacinas, de diferentes estudos, foram elaboradas com adjuvantes. Os adjuvantes são “produtos usados para estimular a reação imunológica do nosso organismo à vacina”, sendo que dois referidos em particular no uso desta vacina são (Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015a):

- GM-CSF (abreviação do inglês *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) – é um fator de crescimento para os glóbulos brancos e imunomodelador (Shi et al., 2006).
- MF-59 – composto que impulsiona a resposta imunitária (Novartis, n.d.), por indução de células imunológicas ao local da injeção que posteriormente reconhecem o antígeno da vacina, induzindo a resposta imunológica (O’Hagan et al, 2012).

Ao utilizar o adjuvante adequado, os investigadores crêem que é possível reduzir o número de vacinas e a quantidade de antígeno na vacina (Fred Hutchinson Cancer Research Center, 2015a; Novartis, n.d.).

4) Como a vacina confere imunização

Por norma as vacinas são injectadas num músculo (Immunisation Advisory Centre, 2011) de forma a minimizar os efeitos adversos locais e criando as condições mais favoráveis à imunogenicidade (Zuckerman, 2000). Assim, uma vez no músculo dão-se as seguintes sequências (Immunisation Advisory Centre, 2011):

- “No caso das vacinas vivas atenuadas, o vírus multiplica-se, imitando uma infeção natural; no caso das vacinas inativas o antígeno dissocia-se do adjuvante;
- As células do Sistema Imunológico Inato reconhecem os antígenos como componentes estranhos ao organismo e absorvem-nos, sendo posteriormente, exibidos na sua superfície celular.
- Através do sistema linfático as células dendríticas chegam ao nódulo linfático, onde apresentam os antígenos aos linfócitos B e T desencadeando uma resposta imunológica mais específica”.

A imunogenicidade da vacina é controlada pela medição dos níveis dos anticorpos específicos após a vacinação. Se, após uma dose de reforço, houver um grande aumento nos níveis de anticorpos no sangue isto indica que há uma boa memória imunológica e alude a uma boa proteção. Note-se que este facto não garante a proteção definitiva à doença mas apenas dá uma estimativa do nível de proteção (Immunisation Advisory Centre, 2012).

III. Desenvolvimento de uma nova vacina

A descoberta de um novo medicamento pode provir de diferentes caminhos como, por exemplo, novas descobertas sobre uma doença que possibilita uma nova abordagem de tratamento, ou o desenvolvimento da tecnologia, permitindo direcionar o medicamento para um sítio específico (FDA, 2015c).

Após a descoberta de um composto promissor são realizados vários testes a fim de adquirir conhecimentos sobre (FDA, 2015c):

- A farmacocinética (ADME) do composto no organismo – absorção, distribuição, metabolização e excreção;
- Mecanismo de ação;
- Potencial uso e dosagem;
- Melhor via de administração;
- Efeitos secundários;
- Interação medicamentosa;
- Efetividade em relação a compostos já existentes.

Assim, são realizados ensaios clínicos (ilustração 9) que são elaborados numa sucessão de fases, cada uma evidenciando respostas aos tópicos supramencionados com a finalidade de garantir um produto passível de ser usado como tratamento médico (NIH, 2008). Contudo, antes de chegar aos ensaios clínicos propriamente ditos é feito um estudo pré-clínico (FDA, 2015b).

Nos ensaios são usados dois medicamentos – o que se pretende analisar e outro de controlo – para posterior comparação de resultados. O medicamento de controlo pode ser um placebo (sem função terapêutica) ou o medicamento *standard* que pré-existente (NHS, 2015).

Contudo, os ensaios não podem começar sem antes os investigadores informarem o Infarmed, em Portugal (INFARMED, 2015), e a FDA, nos EUA (FDA, 2015a).

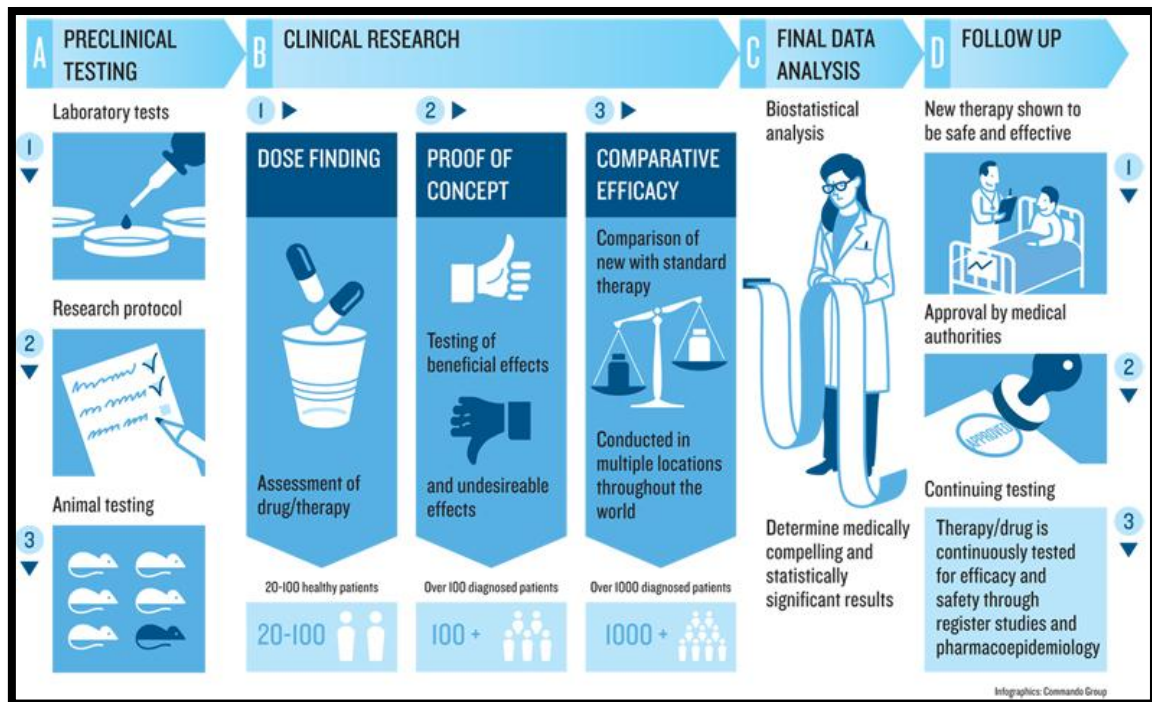


Ilustração 9 - Esquema de um ensaio clínico. Antes de um medicamento chegar ao público passa por diversas fases garantindo a sua segurança, qualidade e eficácia. O medicamento é sujeito a testes pré-clínicos e clínicos antes de ser aprovado e após aprovação a eficácia e segurança continuam a ser testadas. (Retirado de NTA & NordForsk n.d.)

1) Ensaios Pré-clínicos

Estes ensaios são realizados para avaliar o potencial tóxico do fármaco antes de ser testado em humanos. Assim, podem-se fazer testes *In Vitro* e *In Vivo*, sendo os primeiros feitos em recipientes de vidro ou plástico em laboratório e os segundos são feitos recorrendo a organismos vivos ou tecidos. Apesar de serem teste de curta duração, dão informação essencial sobre a dosagem e os níveis de toxicidade (FDA, 2015b).

2) Ensaios Clínicos

Após passarem os ensaios pré-clínicos seguem-se os ensaios clínicos. Estes ensaios já são realizados em pessoas e em cada fase há objetivos a atingir definidos pelos investigadores (FDA, 2015a).

Antes dos ensaios começarem é delineado um protocolo pelo investigador onde se encontra a informação sobre o produto em teste e tendo em conta esta informação são desenvolvidos os objetivos a atingir e perguntas a responder (FDA, 2015a).

i. Ensaios de Fase I

A primeira fase tem com objetivo testar a margem de segurança das dosagens e a segurança do novo medicamento, bem como identificar possíveis efeitos secundários (NHS, 2015; NIH, 2008; FDA, 2015a). É também avaliada qual a melhor via de administração para diminuir efeitos secundários e maximizar a terapêutica. Todas estas informações recolhidas vão ser cruciais para o desenvolvimento da fase II (FDA, 2015a).

Recorre-se entre 20 a 100 pessoas saudáveis e é feito durante alguns meses (FDA, 2015a; NHS, 2015).

ii. Ensaios de Fase II

Reúne informação sobre os efeitos a curto prazo e na eficácia do fármaco (NHS, 2015; FDA, 2015a). Nesta fase ainda não se pode concluir se o fármaco vai ser benéfico, mas os dados de segurança recolhidos vão ser utilizados para aprimorar a fase III (FDA, 2015a).

É feito em mais de cem pessoas doentes e pode durar de alguns meses a dois anos (FDA, 2015a)

iii. Ensaios de Fase III

Nesta fase o novo medicamento é comparado com um medicamento existente ou com um placebo para averiguar a sua eficácia (se há benefícios) e se há alguns efeitos secundário relevantes que antes não foram diagnosticados (NHS, 2015; FDA, 2015a; NIH, 2008).

Envolve desde 300 a 3000 indivíduos doentes, podendo ir de um a quatro anos (NHS, 2015; FDA, 2015a).

iv. *Registo*

Ao passar a fase III, o medicamento pode ser posto à venda e para isso é necessária a aprovação de comercialização pela Agência Europeia de Medicamentos (EMA, do inglês *European Medicines Agency*) ou FDA. A esta agência é fornecida toda a informação recolhida sobre o fármaco até este ponto, com o objetivo de avaliar se o medicamento pode ser ou não aprovado (Pfizer, 2012).

v. *Ensaio de Fase IV*

Esta fase ocorre depois do fármaco ser aprovado pela entidade responsável (FDA ou EMA) e estar disponível nos mercados. Assim, enquanto o medicamento está a ser utilizado, por milhares de pessoas, continua-se a avaliar a segurança, efeitos secundários e eficácia, permitindo a otimização do seu uso (NHS, 2015; FDA, 2015a).

IV. História da vacina para o VIH

Em abril de 1984 Margaret Heckler, Secretária da Saúde dos EUA, afirmou que nos próximos dois anos deveria haver uma vacina pronta a ser testada. Assim, um ano após a declaração, o desenvolvimento da vacina teve os seus primeiros passos e com isso surgiram, igualmente, os primeiros problemas. Dois anos após a afirmação de Margaret foi aprovada a primeira vacina para ensaios clínicos, revelando-se um falhanço pois todos os chimpanzés ficaram infetados (Boskey, 2014a). A seguir ao primeiro ensaio realizado em 1986 já se realizaram mais de 250 sendo que a maioria são de fase I ou II (Wang et al., 2015).

Durante os primeiros dez anos a maioria das vacinas eram feitas com antígenos, pois estes eram a primeira escolha para induzir imunidade humoral contra doenças infecciosas (Miedema, 2008). Portanto, foram desenvolvidas vacinas contendo a proteína gp120 (do VIH-1) com a finalidade de incitar uma resposta humoral específica. Contudo, os ensaios vieram demonstrar que estas vacinas não conseguiam induzir anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs). Além disso, os ensaios da VaxGen indicam que a resposta a estes anticorpos específicos não proporcionam proteção (Wang et al., 2015). Ainda dentro das primeiras tentativas encontram-se “*whole-killed*” VIH e as “*modified vaccine virus*”. Os primeiros contratempos que surgiram serviram para realçar que (Sifris & Myhre, 2013c):

- “Vacinas *whole-killed* (inativas) baseadas no modelo de *Salk* não desencadeiam uma resposta imunológica relevante;
- Como o vírus mata as células do S.I. não chega ativar a imunidade natural do organismo.
- A elevada taxa de mutação do VIH faz com que a criação de apenas uma vacina para várias estirpes seja muito difícil, se não impossível.”

Tendo em conta os desafios encontrados o desenvolvimento virou-se para as vacinas terapêuticas. Isto é, vacinas com o objetivo de diminuir e até parar a progressão da doença nos infetados e não com o objetivo de evitar a infeção. Nestes casos, a vacina considera-se eficaz quando baixa a taxa de infeção em, pelo menos, 50% nos ensaios em humanos (Sifris & Myhre, 2013c).

Em 1994, graças ao trabalho de Hirsh *et alii* (Hirsch et al., 1994), os cientistas viram-se para a proteção obtida por imunidade mediada por células, visto que as vacinas produzidas com o objetivo de ativar a imunidade humoral não estavam a conferir proteção (Wang et al., 2015).

Nesta nova abordagem o ensaio mais afamado é o STEP da Merck que usa adenovírus recombinantes do serótipo 5 (rAd5) como vetor para expressar os genes *gag*, *pol* e *nef* (Sekaly, 2008). Este ensaio foi cancelado em Setembro de 2007 por motivos de segurança (Boskey, 2014b; NIAID, 2013a).

Após o ensaio STEP seguiu-se o RV144 que, em 2009 na Tailândia, foi o primeiro ensaio a demonstrar um resultado positivo com uma eficácia de 31,2% na proteção contra a infeção pelo VIH-1 (Supachai et al., 2009).

Foi igualmente em 2009 que arrancou o ensaio HVTN 505, desenvolvido pela NIAID, que testava um regime de vacinas *prime-boost* de DNA e recombinante. Este ensaio foi cancelado em 2013 por falta de eficácia (NIAID, 2013b).

Após estas três décadas sem nenhuma vacina aprovada para uso humano os estudos continuam e novos caminhos estão a ser perseguidos. Entre os novos trilhos encontram-se: ativação de bNAbs (Gallo, 2005; Wang et al., 2015), recorrer à engenharia/otimização computacional (Fischer et al., 2007) e uma nova abordagem às vacinas de anticorpos (Do Kwon et al., 2015).

1) O ensaio STEP

O ensaio STEP consistiu na avaliação de uma vacina trivalente em que os vetores rAd5 expressavam, respetivamente, os genes *gag*, *pol* e *nef* (Wang et al., 2015; Sekaly, 2008).

Este ensaio teve como objetivo avaliar se a imunidade celular induzida providenciava algum nível de proteção contra a infeção causada pelo VIH-1 ou se reduzia a carga viral no plasma após a infeção (Wang et al., 2015; Sekaly, 2008). Assim, após comparação dos resultados entre quem recebeu a vacina e quem recebeu placebo, verificou-se que a vacina não prevenia nem diminuía a carga viral (Steinbrook,

2007). Outro resultado, inesperado, foi que muitos sujeitos que receberam a vacina ficaram infectados (Wang et al., 2015).

Este ensaio levou a uma nova descoberta no que diz respeito à utilização de rAd5 não atenuados. Devido à anterior exposição aos adenovírus e, consequentemente, ter desenvolvido memória imunológica, levando à rápida eliminação do vírus/vetor. Uma consequência desta situação é a indução das células T tanto pelos anticorpos do vetor como pelo VIH, proporcionando um ambiente favorável à replicação do VIH. Assim, os resultados mostraram que os indivíduos com maior quantidade de anticorpos ao vetor tendiam a ter maior taxa de infecção pelo VIH do que os que não tinham ou apresentavam menos anticorpos de adenovírus (Sekaly, 2008).

2) O ensaio RV144

Como já mencionado, este foi o primeiro resultado positivo obtido na pesquisa da prevenção para o VIH (Wang et al., 2015) e foi conduzido pela MHRP (AVAC, 2015b). Neste ensaio, foi usada uma combinação de duas vacinas *prime-boost*: ALVAC composta pelo vetor *canarypox* vCP1521 para expressar os subtipos E (TH023:gp120) / B (TM gp41) *env* e B *gag/pro*; e a AIDSVAX que é uma vacina sub-unitária de gp120 do subtipo B (MN) e *env* (CM244) do subtipo E. O esquema de vacinação seguido foi administrar ao início, ao primeiro, terceiro e sexto mês a ALVAC e a AIDSVAX ao terceiro e sexto mês (Supachai et al., 2009).

O objetivo deste ensaio foi avaliar a imunogenicidade celular e humoral induzida pela RV144. Os resultados revelaram que, duas semanas após a imunização, este regime induzia uma sólida imunidade humoral em resposta ao gp120 de ambos os subtipos e uma resposta razoável ao p24; o vCP1521 induzia a produção de anticorpos de CD4 em resposta ao VIH-1 *gag* antígeno. (Supachai et al., 2009).

Ademais, devido a outros resultados deste ensaio, foi sugerido que se as próximas vacinas induzirem, comparativamente com este ensaio, níveis superiores de anticorpos V1V2 e menos IgA específicos contra *env*, talvez se obtenha uma melhor eficácia contra a infecção (Wang et al., 2015).

3) O ensaio HVTN 505

O ensaio HVTN 505 incluiu 2,504 voluntários (homens que fazem sexo com homens e transexuais que fazem sexo com homens), tendo como objetivo averiguar se havia prevenção da infecção e/ou redução da carga viral no sangue. Devido aos resultados obtidos no ensaio STEP os voluntários para este ensaio tinham que ser circuncidados e não ter anticorpos para os adenovírus (NIAID, 2013b).

Este ensaio consistiu na avaliação de um regime de vacinas *prime-boost* (ilustração 10): uma de DNA (*prime*) e a segunda era uma vacina recombinante (*boost*). A primeira vacina possuía material genético que expressa os antígenos (proteínas) tanto da superfície como da estrutura interna do VIH; já a segunda vacina usava como vetor um adenovírus do tipo 5 (atenuado) para carregar o material genético que expressa antígenos do VIH. Assim, durante oito semanas foram dadas três imunizações com a vacina de DNA e na vigésima quarta semana foi dada a vacina recombinante (NIAID, 2013b).

Em 2013 este ensaio foi descontinuado pois não foram observadas reduções na carga viral nem prevenções da infecção, além de que foi observado uma taxa de infecção pelo VIH maior no grupo da vacina a ser testada do que no grupo placebo (NIAID, 2013b).

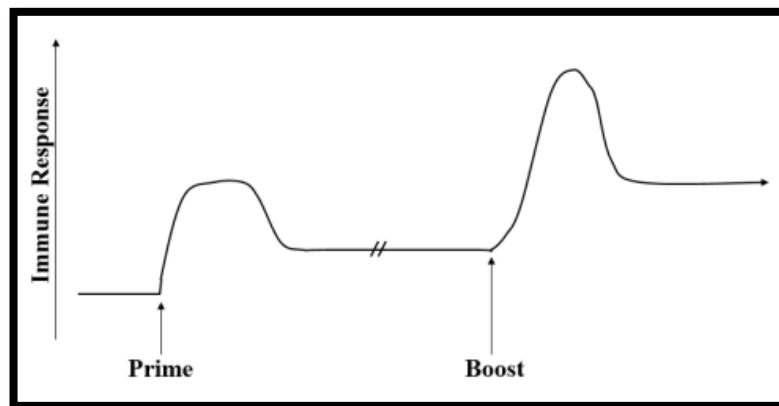
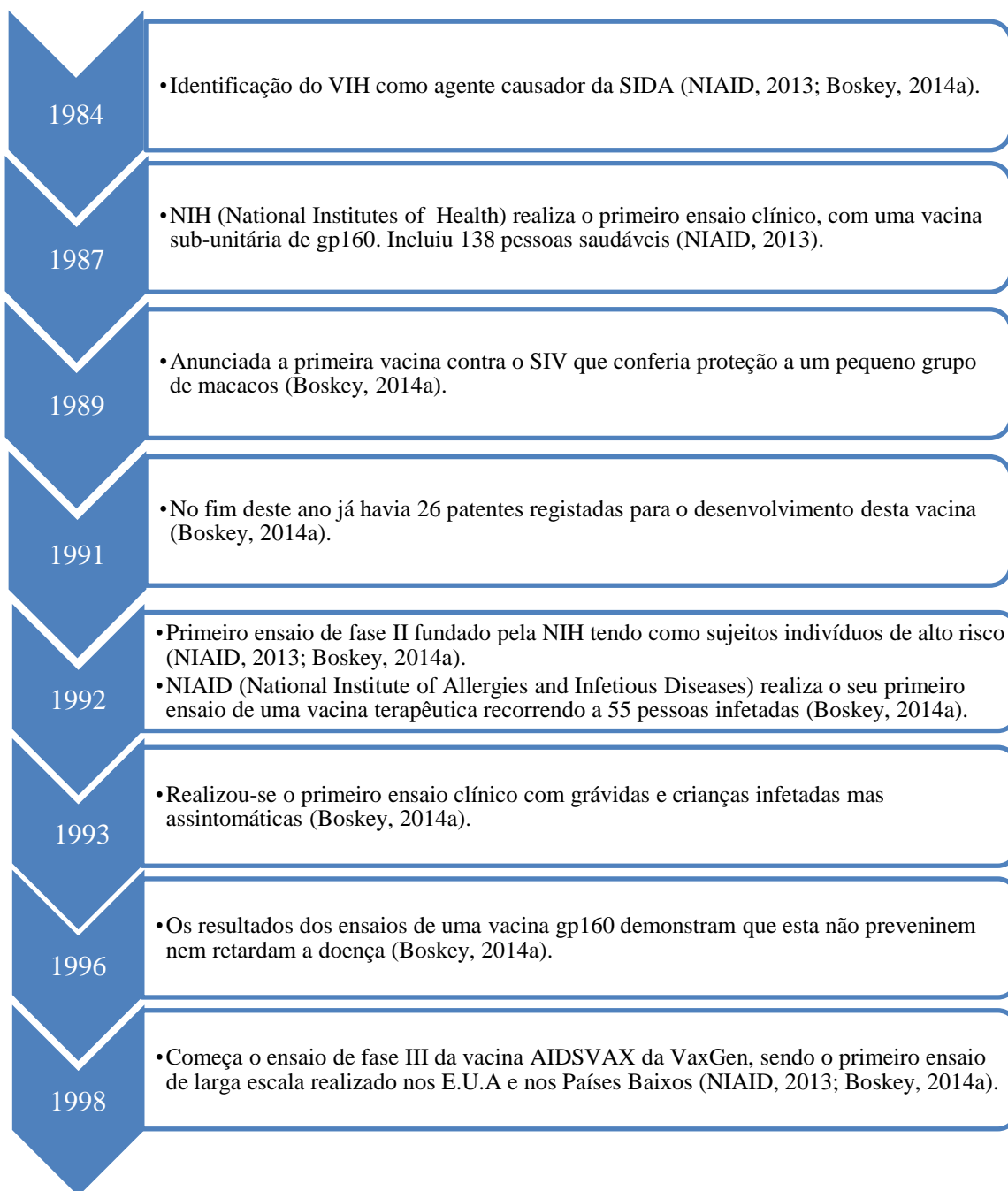


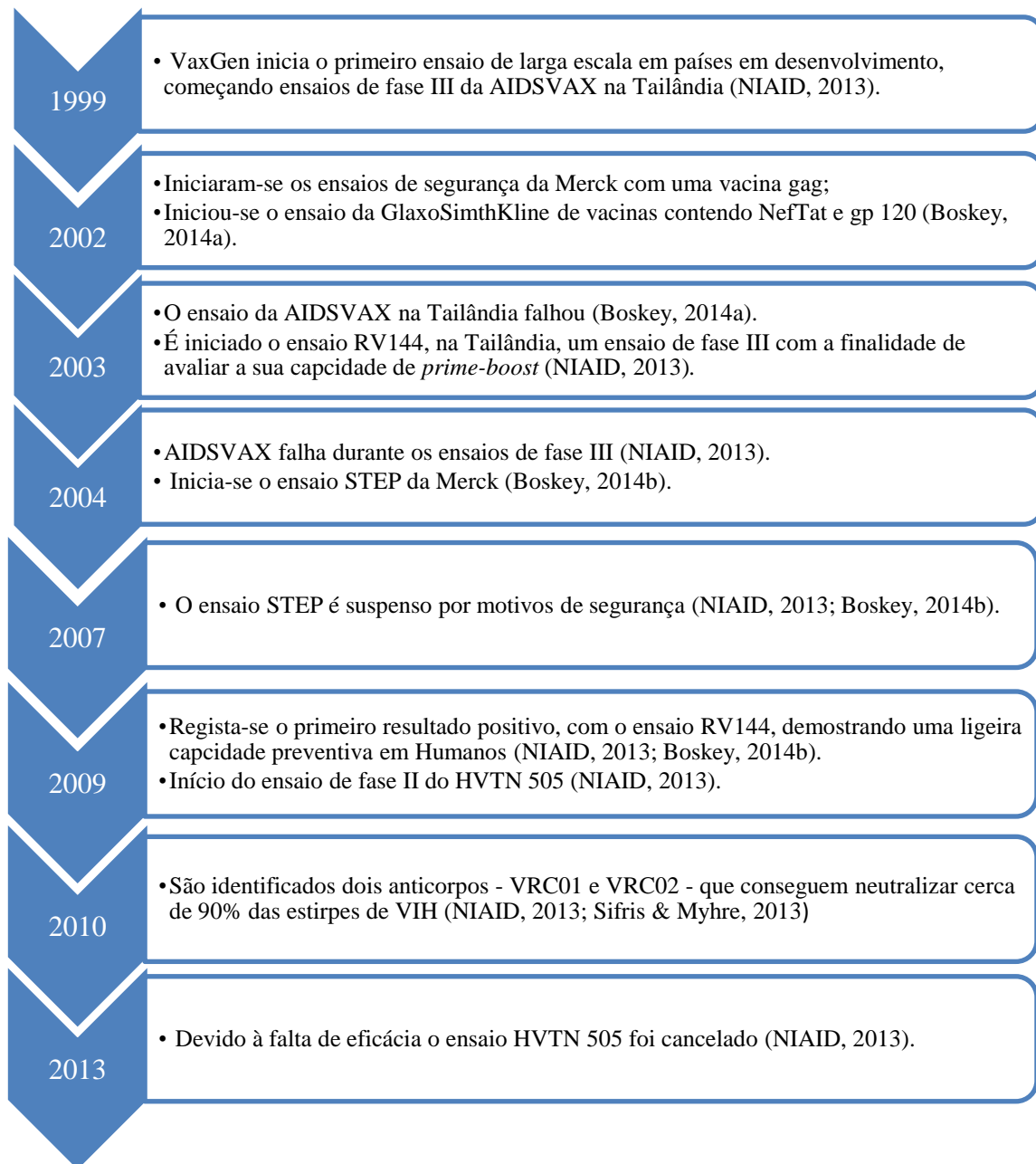
Ilustração 10 - Vacina prime boost. Representação esquemática do objetivo de uma estratégia prime-boost: aumentar a resposta imunitária a antígenos específicos. Com a primeira vacina vão ser apresentados os antígenos pela primeira vez (através das células apresentadoras de antígenos), fazendo que se comece a produção de células T específicas para este alvo. Desta forma, com a segunda vacina ocorre uma segunda apresentação do antígeno, estimulando novamente o S.I. Esta estratégia leva a uma resposta sinérgica do S.I em que há mais células T específicas para o antígeno e mais células com afinidade para o antígeno. (Retirado de Theophilus, 2009; Woodland, 2004)

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

Resumindo e focando nos pontos mais importantes a história da vacina pode ser esquematizada da seguinte forma:



Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.



V. Os obstáculos da vacina

O vírus só por si apresenta-se como uma enorme dificuldade, pois como ninguém recupera da infeção pelo VIH naturalmente, o Sistema Imunitário não vai criar uma resposta imunitária forte o suficiente para prevenir uma segunda infeção, fazendo com que seja difícil para os cientistas encontrarem uma resposta imunitária eficaz contra o VIH. Resumidamente, as dificuldades baseiam-se na grande variabilidade dos tipos de VIH, na falta de imunidade natural ao vírus e falta de conhecimentos dos correlatos de proteção, bem como a pouca fiabilidade dos modelos animais usados (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b).

Além dos problemas relacionados com o vírus, há o problema monetário associado a qualquer desenvolvimento de vacinas, sendo que o custo de apenas uma vacina pode ir desde os US\$ 300 milhões a mais de US\$ 1 bilhão (IAVI, 2012).

1) Tempo de desenvolvimento e Financiamento

Por natureza o desenvolvimento de vacinas para a maioria das doenças infecciosas é um processo moroso, dispendioso e com vários riscos associados. Por exemplo, foram necessários 33 anos a desenvolver a vacina do rotavírus. Contudo, tendo em conta o panorama geral do desenvolvimento das vacinas é defendido que o desenvolvimento da vacina para o VIH vai a um ritmo normal, porém os cientistas acham que este desenvolvimento vai ser mais lento devido à capacidade do vírus de fuga ao S.I. A acrescentar há o facto que leva entre 9 a 14 anos a concluir os ensaios clínicos e apenas 22% das vacinas de fase I chega ao mercado (IAVI, 2012).

No campo financeiro observou-se a necessidade de criar melhores bolsas com objetivos mais definidos, bem como organizações e instituições com o objetivo de alcançar uma solução mais rapidamente e diminuir o custo humano desta epidemia. Desta forma surgiram organizações como a MHRP (Military VIH Research Program) em 1986, em 1996 a parceria público-privada IAVI (International AIDS Vaccine Initiative) e HVTN (VIH Vaccine Trials Network), entre outras (Voronin & Snow, 2013).

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

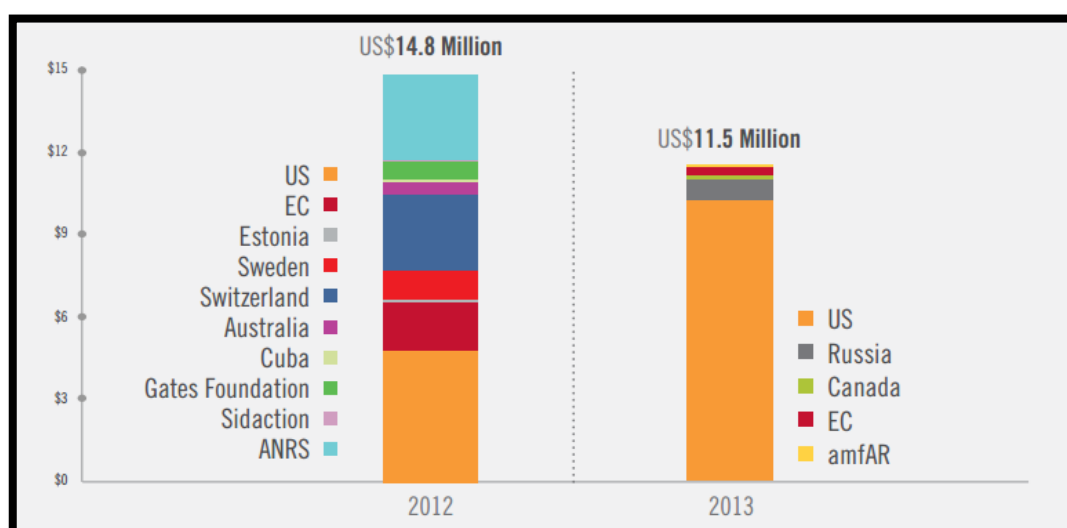
Está estimado um custo superior a US\$ 10.1 bilhões para que uma vacina chegue ao mercado: desde os ensaios clínicos ao adquirir da licença. Já entre 2000 e 2012 está estimado que se tenha gasto US\$ 7.6 bilhões na pesquisa e desenvolvimento sendo que a maioria é gasto na pesquisa e ensaios pré-clínicos (IAVI, 2012).

Em 2013, para a pesquisa e desenvolvimento de uma vacina preventiva, os investimentos públicos desceram para valores ao nível de 2005 (tabela 6) atingindo o valor de US\$ 667 milhões. Os apoios para as vacinas terapêuticas (ilustração 11) também apresentam um decrescimento comparativamente com o ano de 2012, situando-se nos US\$ 11.5 milhões (AVAC et al., 2013).

Tabela 6 - Investimentos Anuais em Investigação e Desenvolvimento de Vacinas Preventivas para o VIH entre 2000 e 2013 (\$US milhões). (Retirado de AVAC et al. 2013)

	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
US	272	314	376	463	516	574	654	659	620	649	632	615	623	584
Europe	23	32	39	44	57	69	82	79	69	65	61	48.5	52	44
Other	10	12	21	24	28	27	38	49	41	31	32	30	31	38
Multilaterals	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	0.5	0.5	0.5
Total Public	307	359	436	532	602	672	776	789	731	746	726	702	707	667
Total Philanthropic	20	7	112	15	12	12	78	88	104	92	103	113	110	120.5
Total Commercial	—	—	—	—	68	75	79	84	33	30	30	30	30	31
Total Global Investment	327	366	548	547	682	759	933	961	868	868	859	845	847	818

Ilustração 11 - Investimento em Investigação e Desenvolvimento em Vacinas Terapêuticas em 2012 e 2013 (\$US milhões). (Retirado de AVAC et al. 2013)



2) *Dificuldades ao desenvolvimento da vacina*

Uma das principais obstruções ao desenvolvimento da vacina é um dado conhecido desde 1984: a variabilidade genética do vírus (Sifris & Myhre, 2015; Girard et al., 2006) e, conseqüentemente, os múltiplos subtipos do vírus (Wang et al., 2015). A este entrave, no início do desenvolvimento da vacina, adicionou-se ausência das tecnologias existentes hoje em dia como a técnica do DNA recombinante (Sifris & Myhre, 2015).

Atualmente, os contratempos encontrados incluem limitações relacionadas com os modelos animais existentes, dificuldades em desenvolver anticorpos neutralizantes e falta de conhecimento dos correlatos⁵ imunogênicos de proteção (Girard et al., 2006).

3) *Administração da vacina*

No caso das vacinas destinadas a indivíduos infectados é importante garantir a administração da vacina antes que o vírus alcance os órgãos linfóides associados às mucosas, fazendo com que haja um período de ação limitado aos estádios muito iniciais da infecção (Miller et al., 2005; Gallo, 2005). Ao administrar no início também se garante uma melhor eficácia da vacina e limitar a formação de reservatórios virais (Ensoli et al., 2014).

4) *A estrutura da vacina*

Segundo *Robert Gallo* pode-se distinguir, pelo menos, cinco problemas principais na elaboração desta vacina, nomeadamente, uma preventiva. Assim, enumeram-se os seguintes factos:

i. Variabilidade genética do vírus e fuga ao Sistema Imunológico

A variação genética do vírus é a principal preocupação/obstáculo com que os cientistas têm lidado (Gallo, 2005). Esta variabilidade é tal que as sequências dos aminoácidos (a.a) das proteínas do invólucro podem diferir em mais de 30% (Gaschen,

⁵ Os correlatos de proteção são “uma resposta imunológica específica que está intimamente relacionada com a proteção contra a infecção” e tanto poderão ser, por exemplo, anticorpos ou células T de memória (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b).

2002), fazendo com que haja uma diversidade muito grande de proteínas dificultando a elaboração de uma vacina baseada nesses antígenos (Watkins, 2012).

Esta variação, que é observada até dentro de um subtipo de VIH, deriva dos erros de transcrição da transcriptase reversa, originando modificações na população viral dentro o indivíduo infetado (Wang et al., 2015). Esta capacidade do vírus permite que o SI não o reconheça e este permanece no organismo (Girard et al., 2006).

A adicionar à sua capacidade de mutação não se pode esquecer que há muitos subtipos deste vírus que são geneticamente distintos entre si, o que dificulta ainda mais a elaboração da vacina pois é difícil que apenas uma vacina proteja de todos os subtipos (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b).

Contribuindo para a permanência do VIH no organismo há a sua capacidade em diminuir a eficiência do complexo principal de histocompatibilidade do tipo I, fazendo com que o reconhecimento pela parte dos linfócitos T citotóxicos se encontre reduzida (Girard et al., 2006).

ii. *Morfologia do VIH*

Para Gallo esta barreira é a mais relevante e deve-se ao facto de este vírus incorporar o seu material genético no DNA do hospedeiro, o que significa que, se não interrompido numa fase inicial da exposição, estabelece-se rapidamente uma infeção para toda a vida (Gallo, 2005).

Outra dificuldade derivada das características estruturais do VIH relaciona-se com o local onde se dá a ligação recetor-coreceptor da molécula gp120. A glicoproteína do invólucro detém este local encoberto nos anéis da zona hipervariável V3 e por resíduos de glicano (Gallo, 2005; Girard et al., 2006). Desta forma, os anticorpos produzidos em resposta à gp120 nem sempre se conseguem ligar o que dificulta a criação de uma resposta neutralizante (Girard et al., 2006) e os que são produzidos apenas se ligam à estirpe que provocou a sua origem (Gallo, 2005). Tendo em conta que o bloqueio desta glicoproteína impede a entrada do vírus na célula, nos primeiros anos os investigadores pensaram que conseguia obter a *sterilising immunity* pelo seu bloqueio através da indução de anticorpos (Gallo, 2005).

As primeiras duas vacinas a chegarem a um ensaio clínico de fase III foram elaboradas com esta base e, confirmaram a falta de eficácia dos anticorpos gerados por vacinas monoméricas de gp120 (Cohen, 2003; Mascola et al., 1996).

iii. *Resposta imunológica*

A resposta imunológica apresenta-se como uma dificuldade pois não se sabe qual o mecanismo que tem que ser induzido para que haja proteção (Gallo, 2005), e não havendo um modelo de imunidade natural torna-se mais árdua a elaboração de uma vacina. Contudo, hoje sabe-se que há indivíduos que conseguem controlar a infecção e impedir a sua progressão para SIDA, estes indivíduos são denominados *elite controllers* e podem representar um novo caminho para o desenvolvimento desta vacina (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b).

Por outro lado, pensa-se que manter a imunidade inata pode ajudar na proteção contra o VIH. Esta teoria tem base nos conhecimentos aprendidos sobre a resistência natural ao vírus que demonstra que, em alguns casos, o mecanismo de proteção está associado ao sistema inato. Contudo, ainda não se sabe como manter uma resposta imune inata durante vários anos nem as consequências associadas (Gallo, 2005).

A ativação de anticorpos, principalmente bNAbs, é um dos objetivos a atingir para que a vacina se torne eficaz (Gallo, 2005), contudo os poucos bNAbs que foram isolados de doentes evidenciam necessitar de uma extensa hipermutação somática dos genes dos anticorpos (Wang et al., 2015).

iv. *Sterilising immunity*

Sterilising immunity é o conceito que se refere a “completa proteção contra uma infecção” e é o objetivo a alcançar com a vacinação. Este é um passo fulcral devido à ação debilitante que este vírus tem no S.I pouco depois da fixação da infecção (Gallo, 2005).

Contudo, no início dos anos noventa, devido aos resultados das vacinas à base de gp120 chegou-se ao consenso que atingir esta imunidade, através de anticorpos, não seria possível e, por isso, o novo objetivo passa pela diminuição e conservação da carga

viral a fim de prevenir a doença. Assim, foram elaboradas vacinas como base na ativação da imunidade mediada por células, usando genes do VIH entregues por um vetor (ex: MVA – “modified vaccinia vírus Ankara”) (Gallo, 2005).

v. *Modelos animais*

Aparecem diversas dificuldades associadas aos modelos animais nomeadamente: a utilização de chimpanzés (*Pan troglodytes*) e macacos nemestrina (*Macaca nemestrina*), que são os únicos que podem suportar a infeção experimental por VIH (não têm manifestações clínicas de SIDA e mantêm uma baixa mas consistente carga viral) (Girard et al., 2006), representam um incremento monetário no ensaio e apenas alguns investigadores estão autorizados a utilizar estes modelos (Gallo, 2005).

Todavia, o estudo do VIH é também feito recorrendo a dados feitos com modelos de macacos portadores de SIV. Esta é outra condição problemática pois é feito com base na suposição de que o que se aprende com um vírus é aplicável ao outro (Gallo, 2005). Efetivamente Ray Greek afirma no seu trabalho que os modelos animais utilizados não são os mais adequados para prever a resposta em humanos (Greek, 2012), isto porque mesmo que seja comprovada a eficácia em primatas não humanos não significa que nos humanos a resposta seja similar, sendo o contrário igualmente válido (Regenmortel, 2012).

Apesar disto, é necessário recorrer a modelos animais porque apenas chega à fase de ensaios em humanos os produtos que tenham obtido resultados favoráveis em animais (Regenmortel, 2012). Contudo, os ensaios das vacinas VIH em animais ainda não forneceram previsões precisas de como estas vacinas irão funcionar em humanos (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b). Assim, o modelo SIV/macaca é o mais apropriado para estudos sobre a resposta imunológica ao VIH visto que, igualmente aos indivíduos infetados com VIH-1, é nos tecidos linfóides associados ao trato gastrointestinal, especialmente nas células T CD4+ e CCR5+, que se observa uma maior replicação vírica e depleção de células T CD4+ (Hel et al., 2002; Franchini et al., 2002). Desta forma, são testadas vacinas de SIV e vacinas híbridas de SIV e VIH na expectativa de usar abordagens idênticas no VIH (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b).

VI. O Futuro

O desenvolvimento desta vacina tem-se demonstrado, claramente, árduo não só pelos óbices mencionados anteriormente como, por exemplo, a incapacidade de gerar bNAbs, mas também devido a preocupações a nível da segurança das vacinas. Tendo em conta estes problemas, as vacinas mais tradicionais – com vírus atenuados, inativas e sub-unitárias – encontram o seu uso limitado para o desenvolvimento desta vacina (Wang et al., 2015).

Apesar da infeção não ser controlada via imunológica, um estudo de 2011 realizado por Scott Hansen *et alii*, veio demonstrar que talvez haja uma forma de controlar imunologicamente a infeção antes de esta se disseminar e haver uma replicação massiva do vírus. Neste ensaio foi testada uma vacina SIV com vetores de citomegalovírus rhesus (RhCMV) em *Rhesus macaques* e foi observado que este vetor faz com que as células T de memória específicas para o SIV permaneçam durante mais tempo e em maior quantidade nos locais de replicação do vírus. Foi também notado que houve um ótimo controlo da infeção pelo SIV_{MAC239} (Hansen et al., 2011). Este ensaio deixa em aberto, para vacinas próximas, a ideia de se usar o citomegalovírus como vetor (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b).

Outro estudo de 2014 por Jean-Marie Andrieu *et alii*, também *Rhesus macaques* apresentou uma vacina que conseguiu bloquear a infeção pelo SIV. Esta vacina consiste em partículas inativadas de SIV_{MAC239} tendo como adjuvantes bactérias vivas. Esta vacina induziu linfócitos T reguladores CD8+ que suprimiu a ativação de linfócitos CD4+ específicos para o SIV, levando a que o vírus não tenha as células de que necessita para se proliferar e, consequentemente, estabelecer infeção. Os resultados demonstraram que 15 dos 29 macacos ficaram completamente protegidos da infeção por SIV. Foram dadas formulações vaginas, retais e orais sendo que apenas a via oral se mostrou completamente eficaz visto que nenhum macaco desse grupo ficou infetado (Andrieu et al., 2014). Dois estudos em humanos estão a ser planeados, incluindo indivíduos VIH-negativos e pessoas infetadas com VIH e em terapia antirretroviral. No primeiro grupo vai se avaliar se induz as mesmas respostas que no ensaio nos primatas; já no segundo grupo vai se avaliar se após a retirada da terapia farmacológica, seis meses após a vacinação, a vacinação surgiu algum efeito ou não (Cairns, 2014b).

Vírus da Imunodeficiência Humana:
O desenvolvimento de uma vacina.

Atualmente existem 35 ensaios clínicos a decorrer sendo que 29 são de fase I e 6 de fase II e I/II. Estes ensaios estão a estudar diferentes tipos de vacinas (ilustração 12) sendo que em fase II encontram-se, por exemplo, vacinas de DNA e vacinas de adenovírus e na fase I há, por exemplo, vacinas de adenovírus e vacinas com vetor, entre outras (AVAC, 2015a).

Vaccine Concept	Vaccine Strategy Phase of research (Locations of trials)	Vaccine Concept	Vaccine Strategy Phase of research (Locations of trials)
Pox-Protein	ALVAC/AIDSVAX Phase II (Thailand)	Adenovirus	Ad26.Mos.HIV + Ad26, MVA or gp140 boost Phase I/II (Rwanda, South Africa, Thailand, Uganda, USA)
DNA	DNA delivered through electroporation Phase II (Mozambique, Tanzania)	Pox-Protein	ALVAC/gp120 MF59 adjuvant Phase I/II (South Africa)
Replicating Vector	Tiantan vector + DNA Phase I/II (China)	Lipopeptide	LIP0-5 Phase I/II (France)
Pox-Protein	ALVAC/AIDSVAX Phase I/II (South Africa)	Adenovirus	Replicating Adenovirus 26 Vector Phase I (US)
DNA + MVA	DNA + MVA Phase I (China, US)	Adenovirus	Ad35.RSV.FA2 Phase I (US)
DNA/Protein	DNA/AIDSVAX Phase I (Uganda, US)	Replicating Vector	SeV-G with Ad35 boost Phase I (Kenya, Rwanda, UK)
Adenovirus	Ad4-mgag and Ad4-EnvC150 Phase I (US)	Replicating Vector	Replicating Ad26 + mosaic insert Phase I (US)

Ilustração 12 - Tipos de Vacinas em Ensaios Clínicos em 2015. Neste esquema encontra-se nas colunas da direita o conceito da vacina em teste seguido, na coluna esquerda, pela estratégia e o local do ensaio. A azul são os ensaios de fase I/II e a laranja os de fase I. (AVAC, 2015)

1) Alterações ao ensaio RV144

Este ensaio é causa para otimismo nesta longa jornada e o próximo passo a tomar é determinar como a combinação utilizada, que obteve uma eficácia de 31.2% (Haynes et al., 2012), protegeu de alguma forma a infeção contra o VIH (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b). Em 2012 o estudo de Barton *et alii* demonstrou que a eficácia da vacina estava relacionada com uma resposta de indução de anticorpos que reagiram a certas regiões das proteínas virais presentes no invólucro e que, muito provavelmente, a resposta por parte das células T não influenciou a proteção (Haynes et al., 2012).

Vários grupos estão a pensar em fazer modificações ao regime do RV144, sendo um desses grupos é o MHRP (Military HIV Research Program) que tenciona melhorar o regime do ensaio anterior e começar um ensaio de eficácia em 2018 (AVAC, 2015b).

Já o HVTN (HIV Vaccine Trials Network), tendo em atenção a prevalência do subtipo C do VIH na África Austral, vai redesenhar o regime do RV144 para esse VIH. Foi em Janeiro deste ano que se iniciou um ensaio deste novo regime – HVTN 100 – em África do Sul. Se no fim de 2016 os resultados forem estimuladores iniciar-se-á outro

ensaio, ainda no fim de 2016 ou início de 2017, chamado HVTN 702 e será em grande escala (AVAC, 2015b).

O grupo P5 (Pox-Protein Public Private Partnership) está a tentar mudar o regime do RV144 com a finalidade de aumentar a eficácia anterior. Para isso estão a ponderar, por exemplo, em aumentar o número de vacinas *boost*, utilizar uma formulação melhor da gp120 ou adicionar um adjuvante (AVAC, 2015b).

2) O ensaio REDUC

Este ensaio é realizado por Lars Jørgen Østergaard e avalia uma vacina terapêutica tendo começado em Março de 2014 e com término previsto para Dezembro de 2015. Este ensaio denomina-se REDUC, e tem como objetivo ativar as células latentes que ficam afetadas e onde não chega a medicação antirretroviral e, consequentemente, as células infetadas ficam visíveis ao S.I (NIH, 2015). Assim, os indivíduos receberam uma primeira dose da vacina (Vacc-4x⁶ e rhuGM-CSF⁷) para estabelecer uma memória imunológica. De seguida foi dado Romidepsin para obrigar o VIH a sair dos reservatórios (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b). Os resultados da fase I demonstraram que o Vacc-4x é imunogénico e contribui para diminuição de carga viral depois da terapêutica antirretroviral ser interrompida. Contudo alguns dos participantes tiveram que voltar à terapia farmacológica deixando em dúvida o benefício da vacinação (Ensoli et al., 2014). No fim deste ano esperam-se os resultados da nova fase do ensaio que vai indicar se a vacina é eficaz a desativar células infetadas (The College of Physicians of Philadelphia, 2014b).

3) *Broadly Neutralizing Antibodies*

No que toca a objetivo final, Gallo defende que se deve mudar o foco da procura dos correlatos de proteção para o VIH para a *steriling immunity*. Robert Gallo baseia esta opção no facto de que, mesmo que se descubram alguns correlatos, estes não são

⁶ Vacc-4x é um composto, desenvolvido pela Bionor, de 4 péptidos que correspondem a regiões conservadas da p24. É usado com o objetivo de induzir, manter ou recuperar células imunes à p24 (Bionor Pharma, n.d.).

⁷ rhuGM-CSF é fator estimulante de colónias de granulócitos e macrófagos humanos (Everly & Lonial, 2005).

um mecanismo comprovado de proteção. Um meio de alcançar este fim seria através do desenvolvimento de programas direcionadas para a indução de bNAbs contra várias estirpes do VIH e que permaneçam durante muito tempo (Gallo, 2005).

Em 2012 Leopold Kong e Quentin Stattentau tentaram desenvolver uma vacina com anticorpos monoclonais neutralizantes ligados a epítomos do invólucro do VIH-1 (Regenmortel, 2012). Posteriormente, estes anticorpos foram utilizados como modelo para criar um epítomo reconhecível por estes anticorpos com o objetivo deste desencadear bNAbs nos indivíduos imunizados. Contudo, isto não se observou e os investigadores concluíram que poderá ser devido à fraca afinidade entre o epítomo e os recetores das células B ou por o epítomo ser pouco imunodominante devido a algum problema estrutural (Kong & Stattentau, 2012).

Atualmente já se descobriram 73 bNAbs (AVAC, 2015a) e este tipo de anticorpos estão a ser alvo de estudo com o objetivo de averiguar se protegem indivíduos VIH negativos através de imunização passiva. Estes anticorpos são feitos laboratorialmente (AVAC, 2015b) e não se conseguem induzir através da vacinação tradicional devido às características já referidas - os bNAbs provêm de altas mutações somáticas. Assim, há a necessidade de se recorrer a outros tipos de abordagens nomeadamente vacinação sequencial e desenvolver imunogénios que ativem especificamente células B que expressem anticorpos germinativos (Wang et al., 2015). Sabendo da existência destes anticorpos, pode-se perceber quais são os seus alvos e tentar desenvolver bNAbs que sejam eficazes contra o VIH (Watkins, 2012).

Apesar da dificuldade em desenvolver estes anticorpos (Girard et al., 2006), estão identificados quatro anticorpos – CH103, VRC01, VRC02 e VRC03 – que apresentam uma boa taxa de neutralização de várias estirpes do VIH em laboratório. O CH103 apresenta uma taxa de neutralização de cerca 55% (Sifris & Myhre, 2013a) e a sequenciação do gene do anticorpo e do vírus (do indivíduo em estudo) revelou uma concomitante evolução do vírus e maturação do anticorpo. Isto significa que, na linhagem ancestral observa-se uma boa ligação à glicoproteína do invólucro do VIH-1 transmitido, e conforme a evolução do vírus a amplitude de neutralização do anticorpo expandiu-se sendo que as modificações se encontram próximo do epítomo do CH103. O trabalho de Liao *et alii* sugere, então, que uma das estratégias a seguir é vacinação sequencial pois desta forma pode-se reproduzir a evolução do VIH e, assim, induzir anticorpos neutralizantes semelhantes ao CH103 (Liao et al., 2013). A descoberta deste

anticorpo deixou desta forma uma pista para o desenvolvimento de uma potencial vacina terapêutica. Em 2010, foram descobertos outros três anticorpos neutralizantes sendo que o VRC01 e VRC02 apresentaram uma taxa de neutralização de cerca 90% das estirpes de VIH e o VRC03 apresentou uma taxa de 57% (Sifris & Myhre, 2013a), por ligação à gp120 vírica (Jardine et al., 2013). O futuro passa por descobrir como induzir a produção destes anticorpos em quantidade suficiente para atingir níveis terapêuticos (Sifris & Myhre, 2013a).

Outra possível forma de induzir (indiretamente) os bNAbs é através do desenvolvimento de imunogénios que ativem especificamente células B que expressem anticorpos germinativos (Wang et al., 2015). Nesta área Jardine *et alii* e McGuire *et alii* demonstraram que os imunogénios desenvolvidos conseguiam-se ligar e ativar os recetores das células B germinativas (Jardine et al., 2013; McGuire et al., 2013). No seu estudo Jardine *et alii* usaram o imunogénio eOD-GT6 multimerizado em nanopartículas e concluíram que desta forma havia ativação tanto da linha germinativa das células B como dos VRC01 maduros. Fica assim aberta a opção de utilizar nanopartículas de eOD-GT6 como uma vacina *prime* (Jardine et al., 2013) com o fim de iniciar o processo de maturação do anticorpo para que mais tarde se venha a formar bNAbs (Wang et al., 2015).

Recentemente Do Kwon *et alii* fizeram um estudo que pode ajudar a indução de bNAbs. Este estudo demonstra que a estrutura do trímero *env* (recetores do invólucro) (ilustração 13), quando livre, é fixa e determina as interações com os recetores. Após análise aos epítomos concluíram que este trímero é estruturalmente compatível com bNAbs. Tendo em conta este resultado criaram uma proteína com a forma (e que se mantém após a ligação) que se pensa que estimule de forma mais eficaz o S.I. de forma a que sejam induzidos anticorpos protetores. Esta manutenção da forma é importante pois esta conformação de pré-fusão celular é necessária para estimular fortes

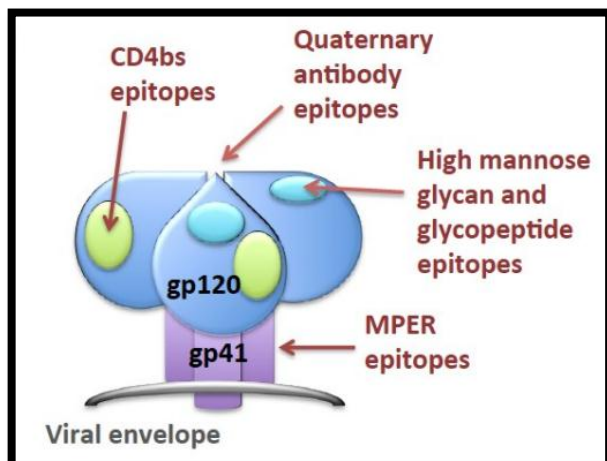


Ilustração 13 - Esquema do trímero *env* realçando os epítomos que se ligam aos bNAbs. (Retirado de Sattentau, 2013).

anticorpos que neutralizem, de forma ampla, o VIH. Desta forma, fica aberta uma nova porta para uma possível nova geração de vacinas de antígeno (Do Kwon et al., 2015).

4) *Novas técnicas*

A nível de técnicas para a elaboração de novas vacinas, os investigadores têm se voltado para novas práticas que consigam uma maior resposta imunológica aos vários subtipos do VIH-1 (Wang et al., 2015), visto que as vacinas desenvolvidas com base em isolados de vírus não têm, até agora, criado uma proteção cruzada contra os vários tipos de VIH (Gaschen, 2002).

Assim, para ultrapassar a extensa variabilidade deste vírus, a vacina poderia ser realizada recorrendo a sequências ancestrais ou de consenso de forma a minimizar as diferenças genéticas entre as estirpes (Gaschen, 2002) ou utilizar proteínas (antígenos) de mosaico (recorrendo a optimização computacional). Estas são a junção de vários fragmentos de sequências naturais mas que por estarem em mosaico maximizam a cobertura por potenciais epítomos das células T. Fischer *et alli* concluíram que com esta apresentação a cobertura da diversidade viral foi muito maior quando comparada com a apresentação das sequências naturais, obtendo os seguintes resultados: 4 proteínas *gag* do mosaico emparelharam perfeitamente com 74% dos 9 a.a dos epítomos e 87% com 8 (dos nove) a.a dos epítomos; enquanto uma proteína *gag* natural apenas emparelha com 37% dos 9 a.a e 67% dos 8 a.a (Fischer et al., 2007).

Este ano foi iniciado um ensaio de fase I/II pela Johnson & Johnson utilizando um imunogénio de mosaico juntamente com um vetor de adenovírus (AVAC, 2015b).

VII. Conclusão

Apesar da terapêutica já existente ajudar as pessoas infetadas a viverem mais anos, a necessidade desta vacina foca-se no auxílio do controlo da propagação desta infeção e ajudar a proteger os indivíduos que ainda não estão infetados.

O desenvolvimento desta vacina tem-se revelado, a nível Mundial, um desafio inigualável tanto na área científica como na moral. Apesar do VIH ser um oponente poderoso e ainda não haver nenhuma vacina desenvolvida, as evidências do ensaio RV144 demonstram que o desenvolvimento de uma vacina é possível e os cientistas estão constantemente a aprender uns com os outros e a usar tecnologia avançada para atingir este objetivo tão aguardado. Contudo, tal como nos fármacos, possivelmente não estaremos apenas à procura de uma, mas sim de uma combinação de vacinas que estimulem de forma mais vigorosa o S.I.

Nesta procura por uma cura para a SIDA tem se desenvolvido tanto vacinas terapêuticas como preventivas, sendo que relativamente às preventivas as terapêuticas apresentam como vantagem poder observar de forma mais rápida e proveitosa a eficácia da mesma. Contudo uma vacina preventiva seria o ideal pois será a forma mais fácil de travar novas infeções e evitar a propagação desta doença.

Uma forma de minimizar os gastos dos ensaios das vacinas preventivas associados à incerteza dos modelos animais, seria realizar os ensaios das vacinas primariamente em indivíduos infetados e só depois avançar para um ensaio preventivo.

Outras técnicas estão a ser pesquisadas entre elas a indução anticorpos altamente neutralizantes ou a utilização de proteínas de mosaico. Ainda há muito caminho para percorrer, técnicas para aprimorar e novas técnicas para experimentar e disso são exemplo os ensaios que ainda estão decorrer e os que estão a ser planeados.

VIII. Referências Bibliográficas

- AIDS. A Time line of AIDS. [Em linha]. Disponível em < <http://aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101/aids-timeline/>>. [Consultado em 05/01/2014]
- AIDS (2010a). CD4 Count. [Em linha]. Disponível em < <http://www.aids.gov/hiv-aids-basics/just-diagnosed-with-hiv-aids/understand-your-test-results/cd4-count/>>. [Consultado em 05/01/2014]
- AIDS (2010b). Opportunistic Infections. [Em linha]. Disponível em < <http://aids.gov/hiv-aids-basics/staying-healthy-with-hiv-aids/potential-related-health-problems/opportunistic-infections/>>. [Consultado em 05/01/2014]
- AIDS (2013a). FDA approves first rapid diagnostic test to detect both HIV-1 antigen and HIV-1/2 antibodies. [Em linha]. Disponível em < <http://blog.aids.gov/2013/08/fda-approves-first-rapid-diagnostic-test-to-detect-both-hiv-1-antigen-and-hiv-12-antibodies.html>>. [Consultado em 05/01/2014]
- AIDS (2013b). HIV 101: Signs and Symptoms. [Em linha]. Disponível em <<http://aids.gov/hiv-aids-basics/hiv-aids-101/signs-and-symptoms/>>. [Consultado em 05/01/2014]
- AIDSPortugal (2002). Contagem de CD4. [Em linha]. Disponível em < http://www.aidsportugal.com/Modules/WebC_AIDS/Articles/ViewArticles.aspx?Mid=177&Aid=3099>. [Consultado em 05/01/2014]
- Alere (2013). Alere Determine™ HIV-1/2 Ag/Ab Combo. [Em linha]. Disponível em <<http://www.alere.com/za/en/product-details/determine-1-2-ag-ab-combo.html>> [Consultado em 09/02/2014]
- Andrieu, J.M. et al. (2014). Mucosal SIV vaccines comprising inactivated virus particles and bacterial adjuvants induce CD8⁺T-regulatory cells that suppress SIV positive CD4⁺ cell activation and prevent SIV infection in the macaque model. . *Frontiers in Immunology* , 5 . [Em linha]. Disponível em <http://www.frontiersin.org/Journal/Abstract.aspx?s=1238&name=hiv_and_aids&ART_Doi=10.3389/fimmu.2014.00297>. [Consultado em 01/09/2015]

Aragón,T.J. & Reingold,A. (2011). Epidemiologic Concepts for the Prevention and Control of Infectious Diseases. **[Em linha]. Disponível em** <
http://www.academia.edu/1746565/Epidemiologic_Concepts_for_the_Prevention_and_Control_of_Infectious_Diseases > **[Consultado em 01/09/2015]**.

AVAC *et alii*. (2013). HIV Prevention Research & Development Investment in 2013 **[Em linha]. Disponível em** < <http://www.avac.org/resource/hiv-prevention-research-development-investment-2013-changing-global-development-economic-0>>. **[Consultado em 04/09/2015]**

AVAC (2015a). AIDS Vaccines by the Numbers: trials, discoveries, money and more. **[Em linha]. Disponível em** < <http://www.avac.org/resource/hvad-by-the-numbers> >. **[Consultado em 12/09/2015]**

AVAC (2015b). AIDS Vaccines: An Introductory Factsheet. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.avac.org/resource/aids-vaccines-introductory-factsheet>>. **[Consultado em 12/09/2015]**

AVERT (2013). Origin of HIV & AIDS. **[Em linha]. Disponível em** < <http://www.avert.org/origin-hiv-aids.htm>>. **[Consultado em 09/02/2014]**

AVERT (2014). HIV strains: types, groups and subtypes. **[Em linha]. Disponível em** < <http://www.avert.org/hiv-types.htm>>. **[Consultado em 09/02/2014]**

BBC (2014). O vírus HIV. **[Em linha]. Disponível em** <http://www.bbc.co.uk/portuguese/especial/1357_biologia_aids/page2.shtml>. **[Consultado em 09/02/2014]**

Berger,G. et al. (2011). APOBEC3A Is a Specific Inhibitor of the Early Phases of HIV-1 Infection in Myeloid Cells. *PLoS Pathog*, 7(9), p.e1002221.

Bionor Pharma. A potential therapeutic HIV vaccine - Vacc-4x. **[Em linha]. Disponível em** <
http://www.bionorpharma.com/en/Vaccines+_technology/HIV_vaccine_Vacc-4x/>. **[Consultado em 20/09/2015]**

- Boskey,E. (2012). What is a Functional Cure for HIV? **[Em linha]. Disponível em** <<http://std.about.com/od/HIV-Treatment-Issues/f/What-Is-A-Functional-Cure-For-HIV.htm>>. **[Consultado em 08/02/2014]**
- Boskey,E. (2014a). A Timeline of HIV Vaccine Research - The First 20 Years. **[Em linha]. Disponível em** < <http://std.about.com/od/hivaids/a/vactimelineearly.htm>>. **[Consultado em 05/06/2014]**
- Boskey,E. (2014b). A Timeline of HIV Vaccine Research - Where We Are After 20 Years. **[Em linha]. Disponível em** < <http://std.about.com/od/hivaids/a/vactimeline2004.htm>>. **[Consultado em 05/06/2014]**
- Cairns,G. (2014a). European CDC cautious about PrEP. **[Em linha]. Disponível em** < <http://www.aidsmap.com/European-CDC-cautious-about-PrEP/page/2891977/> >. **[Consultado em 08/02/2015]**
- Cairns,G. (2014b). Novel immune-suppressant vaccine completely blocks HIV infection in monkeys: human trials planned. **[Em linha]. Disponível em** <: <http://www.aidsmap.com/Novel-immune-suppressant-vaccine-completely-blocks-HIV-infection-in-monkeys-human-trials-planned/page/2902377/>>. **[Consultado em 20/09/2015]**
- Campos,M.J. & Freitas,M. (2013). Introdução à terapêutica de combinação para a infecção pelo VIH. , pp.1–52.
- CDC (2014a). About HIV/AIDS. **[Em linha]. Disponível em** < <http://www.cdc.gov/hiv/basics/whatishiv.html>>. **[Consultado em 07/02/2014]**
- CDC (2014b). HIV Transmission. **[Em linha]. Disponível em** < <http://www.cdc.gov/hiv/basics/transmission.html>>. **[Consultado em 07/02/2014]**
- Cichocki,M. (2007a). HIV Viral Load - What Is It And Why Is It Important. **[Em linha]. Disponível em** < <http://aids.about.com/od/technicalquestions/f/viralload.htm>>. **[Consultado em 10/02/2014]**

Cichocki,M. (2007b). How Long Does it Take for HIV to Progress to AIDS? **[Em linha]. Disponível em** < <http://aids.about.com/cs/aidsfactsheets/f/blhowlong.htm> > **[Consultado em 10/02/2014]**

Cichocki,M. (2007c). What is a CD4 Count and Why is it Important? **[Em linha]. Disponível em** <<http://aids.about.com/od/technicalquestions/f/cd4.htm>>. **[Consultado em 10/02/2014]**

Cichocki,M. (2007d). What is HIV-2? **[Em linha]. Disponível em** < <http://aids.about.com/od/newlydiagnosed/a/hiv2.htm>>. **[Consultado em 10/02/2014]**

Cichocki,M. (2008). HIV Vaccine Development - What is The Status. **[Em linha]. Disponível em** < <http://aids.about.com/od/hivpreventionquestions/f/hivvaccine.htm>>. **[Consultado em 10/02/2014]**

Cichocki,M. (2009a). HAART - Highly Active Antiretroviral Therapy. **[Em linha]. Disponível em** < <http://aids.about.com/od/hivaidsletterh/g/haartdef.htm>>. **[Consultado em 10/02/2014]**

Cichocki,M. (2009b). Symptoms of HIV - What Does HIV Do to Your Body? **[Em linha]. Disponível em** < <http://aids.about.com/od/frequentlyaskedquestions/f/hivdo.htm>>. **[Consultado em 10/02/2014]**

Cichocki,M. (2010). HIV Information. **[Em linha]. Disponível em** < <http://aids.about.com/cs/aidsfactsheets/a/hivbasics.htm>>. **[Consultado em 10/02/2014]**

Cohen,J. (2003). AIDS vaccine trial produces disappointment and confusion. *Science*, 299(5611), pp.1290–1291.

DGS (2014). Programa Nacional de Prevenção e Controlo da Infecção VIH/SIDA 2012-2016. **[Em linha]. Disponível em** <<http://sida.dgs.pt/programa-nacional1111111111.aspx>>. **[Consultado em 07/02/2014]**

- Diniz,A. *et alii*. (2013). Portugal: Infecção VIH/SIDA e Tuberculose: em números - 2013.
- Doitsh,G. *et alii*. (2010). Abortive HIV Infection Mediates CD4 T Cell Depletion and Inflammation in Human Lymphoid Tissue. *Cell*, 143(5), pp.789–801.
- Doitsh,G. *et alii*. (2014). Cell death by pyroptosis drives CD4 T-cell depletion in HIV-1 infection. *Nature*, 505(7484), pp.509–514.
- ECDC (2014). HIV infection and AIDS. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/aids/Pages/index.aspx>>. **[Consultado em 07/02/2014]**
- Ensoli,B. *et alii* (2014). Challenges in HIV Vaccine Research for Treatment and Prevention. *Frontiers in Immunology*, 5, p.417.
- Everly,J.J. & Lonial,S. (2005). Immunomodulatory effects of human recombinant granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rhuGM-CSF): evidence of antitumour activity. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 5(3), pp.293–311.
- FDA (2015a). Clinical Research. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/ucm405622.htm>>. **[Consultado em 08/09/2015]**
- FDA (2015b). Preclinical Research. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/ucm405658.htm>>. **[Consultado em 08/09/2015]**
- FDA (2015c). Step 1: Discovery and Development. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.fda.gov/ForPatients/Approvals/Drugs/ucm405382.htm>>. **[Consultado em 08/09/2015]**
- Fink,S.L. & Cookson,B.T. (2005). Apoptosis, Pyroptosis, and Necrosis: Mechanistic Description of Dead and Dying Eukaryotic Cells . *Infection and Immunity*, 73(4), pp.1907–1916.

- Fischer,W. *et alii* (2007). Polyvalent vaccines for optimal coverage of potential T-cell epitopes in global HIV-1 variants. *Nat Med*, 13(1), pp.100–106.
- Franchini,G. *et alii* (2002). Immune intervention strategies for HIV-1 infection of humans in the SIV macaque model. *Vaccine*, 20(4), pp.A52–60.
- Fred Hutchinson Cancer Research Center (2015a). How Vaccines Works. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.hvtn.org/en/science/hiv-vaccine-basics/how-vaccines-work.html>>. **[Consultado em 01/02/2015]**
- Fred Hutchinson Cancer Research Center (2015b). Types Of Vaccines. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.hvtn.org/en/science/hiv-vaccine-basics/types-vaccines.html>>. **[Consultado em 26/01/2015]**
- Fred Hutchinson Cancer Research Center (2015c). Why is an HIV vaccine needed? **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.hvtn.org/en/science/hiv-vaccine-basics/why-hiv-vaccine.html>>. **[Consultado em 07/02/2015]**
- Gallo,R.C. (2005). The end or the beginning of the drive to an HIV-preventive vaccine: a view from over 20 years. *Lancet*, 366(9500), pp.1894–8.
- Gaschen,B. (2002). Diversity considerations in HIV-1 vaccine selection. *Science*, 296, pp.2354–2360. Available at: <http://dx.doi.org/10.1126/science.1070441>.
- GAT (2014). Conferência revela 30 mitos sobre infecção por VIH. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.gatportugal.org/content/default.asp?idcat=NoticiasGerais&idCatM=Atualidades&idContent=E8775458-A848-4856-A813-1E2370B8D03C>>. **[Consultado em 07/02/2015]**
- Girard,M.P. *et alii* (2006). A review of vaccine research and development: The human immunodeficiency virus (HIV). *Elsevier*.
- Goldblatt,D. (2000). Conjugate Vaccines. *Clinical & Experimental Immunology*, 119(1), pp.1–3.

- Greek,R. (2012). Animal Models and the Development of an HIV Vaccine. *Journal AIDS & Clinical Research*, S8:001.
- Hansen,S.G. *et alii* (2011). Profound early control of highly pathogenic SIV by an effector memory T-cell vaccine. *Nature*, 473(7348), pp.523–527.
- Haynes,B.F. *et alii* (2012). Immune-Correlates Analysis of an HIV-1 Vaccine Efficacy Trial. *New England Journal of Medicine*, 366(14), pp.1275–1286.
- Hel,Z. *et alii* (2002). Containment of simian immunodeficiency virus infection in vaccinated macaques: correlation with the magnitude of virus specific pre and postchallenge CD4+ and CD8+ T cell responses. *J Immunol*, 169(9), pp.4778–87.
- Hirsch,V.M. *et alii* (1994). Prolonged clinical latency and survival of macaques given a whole inactivated simian immunodeficiency virus vaccine. *Journal of Infectious Diseases*, 170(1), pp.51–59.
- IAVI (2012). AIDS Vaccine Development Costs and Timelines in Context Costly : HIV Vaccine Development : likely to take longer and cost more than other vaccines. **[Em linha]. Disponível em** <[http://www.iavi.org/Information-Center/Publications/Documents/AIDS Vaccine Development Costs and Timelines.pdf](http://www.iavi.org/Information-Center/Publications/Documents/AIDS_Vaccine_Development_Costs_and_Timelines.pdf)>. **[Consultado em 07/02/2015]**
- Immunisation Advisory Centre (2012). Duration of Protection, Efficacy and Effectiveness. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.immune.org.nz/duration-protection-efficacy-and-effectiveness>>. **[Consultado em 25/01/2015]**
- Immunisation Advisory Centre (2011). Types of vaccines. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.immune.org.nz/types-vaccines>>. **[Consultado em 07/02/2015]**

- INFARMED (2015). Formato da documentação a ser apresentada ao INFARMED, I.P. no âmbito de um pedido de Autorização de Ensaio Clínico, e de Alteração Substancial, de uma notificação de Conclusão de Ensaio Clínico, de uma notificação de Suspeita de Reação Adversa Grave Ines. **[Em linha]. Disponível em** http://www.infarmed.pt/portal/page/portal/INFARMED/MEDICAMENTOS_USO_HUMANO/ENSAIOS_CLINICOS/submissao_INFARMED/InstrucoesRequerente_27jul15.pdf >. **[Consultado em 08/09/2015]**
- Jardine, J. *et alii* (2013). Rational HIV Immunogen Design to Target Specific Germline B Cell Receptors. *Science*, 340 (6133), pp.711–716.
- Kong, L. & Sattentau, Q.J. (2012). Antigenicity and Immunogenicity in HIV-1 Antibody-Based Vaccine Design. *Journal of AIDS & clinical research*, Suppl 8, p.3.
- Do Kwon, Y. *et alii* (2015). Crystal structure, conformational fixation and entry-related interactions of mature ligand-free HIV-1 Env. *Nat Struct Mol Biol*, advance on..
- LANSLC (2006). Genome Maps. **[Em linha]. Disponível em** <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/pdf/2000/intro/GenomeMaps.pdf> >. **[Consultado em 02/03/2014]**
- Liao, H.-X. *et alii* (2013). Co-evolution of a broadly neutralizing HIV-1 antibody and founder virus. *Nature*, 496(7446), pp.469–476.
- Mascola, J.R. *et alii* (1996). Immunization with envelope subunit vaccine products elicits neutralizing antibodies against laboratory-adapted but not primary isolates of human immunodeficiency virus type 1. The National Institute of Allergies and Infectious Diseases AIDS Vaccine Eval. *J Infect Dis*, 173(2), pp.340–8.
- McGuire, A.T. *et alii* (2013). Engineering HIV envelope protein to activate germline B cell receptors of broadly neutralizing anti-CD4 binding site antibodies. *The Journal of Experimental Medicine*, 210 (4), pp.655–663.
- Mendes, N.F. (2000). Origem do HIV e da Epidemia. In R. Veronesi, R. Focaccia, & A. V. Lomar, eds. *Retrovírus Humanos HIV/AIDS*. São Paulo: Atheneu, pp. 13–14.

- Miedema,F. (2008). A brief history to HIV vaccine research: stepping back to the drawing board? *AIDS*, 22(14), pp.1699–1703.
- Miller,C. *et alii* (2005). Propagation and dissemination of infection after vaginal trasmission of simiam immunodeficiency virus. *J Virol*, 79(14), pp.9217–27.
- Monroe,K.M. *et alii* (2014). IFI16 DNA sensor is required for death of lymphoid CD4 T cells abortively infected with HIV. *Science*, 343(6169), pp.428–432.
- Neil,S.J.D. *et alii* (2008). Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu. *Nature*, 451(7177), pp.425–430.
- NHS (2015). Clinical trials and medical research - Phases of trials. [Em linha]. Disponível em <<http://www.nhs.uk/conditions/Clinical-trials/Pages/Phasesoftrials.aspx>>. [Consultado em 07/09/2015]
- NIAID (2010). Community Immunity. [Em linha]. Disponível em <<http://www.niaid.nih.gov/topics/Pages/communityImmunity.aspx>>. [Consultado em 25/01/2015]
- NIAID (2013a). History of HIV Vaccine Research. [Em linha]. Disponível em <<http://www.niaid.nih.gov/topics/hivaids/research/vaccines/Pages/history.aspx>>. [Consultado em 15/05/2015]
- NIAID (2013b). NIH Discontinues Immunizations in HIV Vaccine Study. [Em linha]. Disponível em <<http://www.niaid.nih.gov/news/newsreleases/2013/Pages/HVTN505April2013.aspx>>. [Consultado em 25/06/2015]
- NIH (2004). How HIV Causes AIDS. [Em linha]. Disponível em <<http://web.archive.org/web/20050531012945/http://www.niaid.nih.gov/factsheets/howhiv.htm>>. [Consultado em 25/06/2014]
- NIH (2008). Clinical Trial Phases. [Em linha]. Disponível em <<https://www.nlm.nih.gov/services/ctphases.html>>. [Consultado em 07/09/2015]

NIH (2012). HIV Vaccine Designs and Strategies. [Em linha]. Disponível em <<http://www.niaid.nih.gov/topics/HIVAIDS/Research/vaccines/Pages/strategies.aspx>>. [Consultado em 07/09/2015]

NIH (2015). Safety and Efficacy of the Histone Deacetylase Inhibitor Romidepsin and the Therapeutic Vaccine Vacc-4x for Reduction of the Latent HIV-1 Reservoir (REDUC). [Em linha]. Disponível em <<https://clinicaltrials.gov/show/NCT02092116>>. [Consultado em 07/09/2015]

Nomaguchi, M. *et alii* (2012). Species tropism of HIV-1 modulated by viral accessory proteins. *Frontiers in Microbiology*, 3.

Novartis. MF59® Adjuvant Fact Sheet. [Em linha]. Disponível em <<http://www.novartisvaccines.com/downloads/diseases-products/MF59-Adj-fact-sheet.pdf>>. [Consultado em 05/02/2015]

NTA & NordForsk. Clinical Trials Explained. [Em linha]. Disponível em <<http://nta.nordforsk.org/for-patients/clinical-trials/clinical-trials-explained/>>. [Consultado em 08/09/2015]

O'Hagan, D.T. *et alii* (2012). The mechanism of action of MF59 - an innately attractive adjuvant formulation. *Vaccine*, 30(29), pp.4341–8.

Pal, S. *et alii* (2013). In-silico designing of a potent analogue against HIV-1 Nef protein and protease by predicting its interaction network with host cell proteins. *Journal of Pharmacy & BioAllied Sciences*, 5(1), pp.66–73.

Pereira, J.M. & Tavares, L. (2002). Retrovírus. In W. F. C. Ferreira & J. C. F. de Sousa, eds. *Microbiologia - Volume 3*. LIDL, pp. 275–313.

Pfizer (2012). As fases de desenvolvimento. [Em linha]. Disponível em <<https://www.pfizer.pt/As-fases-de-desenvolvimento-171.aspx>>. [Consultado em 07/08/2015]

- Público (2013). Portugal é o terceiro país europeu com maior taxa de novos casos de sida. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.publico.pt/sociedade/noticia/portugal-e-o-terceiro-pais-europeu-com-maior-taxa-de-novos-casos-de-sida-1614132>>. **[Consultado em 07/05/2015]**
- Rambaut,A. *et alii* (2004). The causes and consequences of HIV evolution. *Nat Rev Genet*, 5(1), pp.52–61.
- Ramirez,V.B. (2014). What Is R0?: Gauging Contagious Infections. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.healthline.com/health/r-nought-reproduction-number#Overview1>>. **[Consultado em 01/09/2015]**
- Regenmortel,M.H. (2012). An Introduction to the Current State of HIV Vaccine Research . *Journal AIDS & Clinical Research*, S8:001.
- Roche (2014a). A SIDA em Portugal. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.roche.pt/sida/estatisticas/portugal.cfm>>. **[Consultado em 07/05/2015]**
- Roche (2014b). O que é a SIDA: Sintomas. **[Em linha]. Disponível em** <http://www.roche.pt/sida/o_que_e_a_sida/hivsida2.cfm>. **[Consultado em 07/05/2015]**
- Roche (2014c). O vírus da SIDA: o ciclo de vida do vírus VIH. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.roche.pt/sida/virus/ciclovida.cfm>>. **[Consultado em 07/05/2015]**
- Sabino,E.C. & Saéz-Alquézar,A. (2000). Etiologia e Subtipos do HIV. In R. Veronesi, R. Focaccia, & A. V. Lomar, eds. *Retroviroses Humanas HIV/AIDS*. São Paulo: Atheneu, pp. 1–6.
- San Francisco AIDS Foundation (2014a). What do the test result means? **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.sfaf.org/hiv-info/basics/what-do-the-test-results-mean.html>>. **[Consultado em 07/05/2015]**
- San Francisco AIDS Foundation (2014b). What is the difference between HIV and AIDS? **[Em linha]. Disponível em** <<http://sfaf.org/hiv-info/basics/what-is-difference-between-hiv-aids.html>>. **[Consultado em 12/05/2014]**

- Sattentau,Q.J. (2013). Envelope Glycoprotein Trimers as HIV-1 Vaccine Immunogens. *Vaccines*, 1(4), pp.497–512.
- Schooley,R.T. & Veronesi,R. (2000). Vacinas. In R. Veronesi, R. Focaccia, & A. V. Lomar, eds. *Retroviroses Humanas HIV/AIDS*. São Paulo: Atheneu, pp. 351–355.
- Sekaly,R.-P. (2008). The failed HIV Merck vaccine study: a step back or a launching point for future vaccine development? *J Exp Med*, 205, pp.7–12.
- Shah,I. (2012). HIV Virus. **[Em linha]. Disponível em** <http://www.hivinchildren.org/Transmission/Hiv_Virus.aspx#.UxyNaz9_v34>. **[Consultado em 12/05/2014]**
- Sheehy,A.M. *et alii* (2002). Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418, pp.646–650.
- Shi,Y. *et alii* (2006). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) and T-cell responses: what we do and don't know. *Cell Res*, 16(2), pp.126–133.
- Sifris,D. & Myhre,J. (2013a). Antibody Points Researchers to a Possible HIV Vaccine Model. **[Em linha]. Disponível em** <<http://aids.about.com/b/2013/04/07/antibody-points-researchers-to-a-possible-hiv-vaccine-model.htm>>. **[Consultado em 12/06/2015]**
- Sifris,D. & Myhre,J. (2013b). What is HIV/AIDS? **[Em linha]. Disponível em** <<http://aids.about.com/od/aidsfactsheets/f/What-Is-Hiv.htm>>. **[Consultado em 12/05/2014]**
- Sifris,D. & Myhre,J. (2013c). When Will We Have an HIV Vaccine? **[Em linha]. Disponível em** <<http://aids.about.com/od/clinicaltrials/a/When-Will-We-Have-An-Hiv-Vaccine.htm>>. **[Consultado em 12/05/2014]**
- Sifris,D. & Myhre,J. (2014). Symptoms of HIV by Stage. **[Em linha]. Disponível em** <<http://aids.about.com/od/frequentlyaskedquestions/a/Symptoms-Of-Hiv.htm>>. **[Consultado em 12/05/2014].**

Sifris,D. & Myhre,J. (2015). When Will We Have An HIV Vaccine? **[Em linha]. Disponível em** <<http://aids.about.com/od/clinicaltrials/a/When-Will-We-Have-An-Hiv-Vaccine.htm>>. **[Consultado em 12/05/2014].**

Skwarecki,B. (2013). Cells' Fiery Suicide in HIV Provides New Treatment Hope. *Scientific American*. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.scientificamerican.com/article/cells-fiery-suicide-in-hiv-provides-hope/>>. **[Consultado em 24/07/2015]**

Stefani,M. *et alii* (1998). Entendendo como o HIV infecta células humanas: quimiocinas e seus recetores. *Revista de Patologia Tropical*, 27(1), pp.1–10.

Steinbrook,R. (2007). One Step Forward, Two Steps Back — Will There Ever Be an AIDS Vaccine? *The New England Journal of Medicine*, 357(26), pp.2653–2655.

Supachai,R.-N. *et alii* (2009). Vaccination with ALVAC and AIDSVAX to Prevent HIV-1 Infection in Thailand. *The New England Journal of Medicine*, 361(23), pp.2209–2220.

The AIDS Institute (2011). Where did HIV come from? **[Em linha] Disponível em** <<http://www.theaidsinstitute.org/node/259>> **[Consultado em 24/07/2015].**

The College of Physicians of Philadelphia (2014a). Different Types of Vaccines. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.historyofvaccines.org/content/articles/different-types-vaccines>>. **[Consultado em 25/01/2015]**

The College of Physicians of Philadelphia (2014b). The Development of HIV Vaccines. **[Em linha]. Disponível em** <<http://www.historyofvaccines.org/content/articles/development-hiv-vaccines>>. **[Consultado em 24/07/2015]**

Theophilus, S., (2009). Prime Boost Strategy. **[Em linha]. Disponível em** <http://image.slidesharecdn.com/hiv-vaccines-overview-1233836472543892-1/95/hiv-vaccines-overview-13-728.jpg?cb=1233815027>>. **[Consultado em 15/10/2015]**

U.S. Department of Health and Human Services (2013). Types of Vaccines. **[Em linha]. Disponível em** http://www.vaccines.gov/more_info/types/>. **[Consultado em 24/01/2015]**

UNAIDS (2013a). *Global Report: UNAIDS report on the global AIDS epidemic 2013*, **[Em linha]. Disponível em** http://www.unaids.org/sites/default/files/en/media/unaids/contentassets/documents/epidemiology/2013/gr2013/UNAIDS_Global_Report_2013_en.pdf>. **[Consultado em 24/07/2015]**

UNAIDS (2013b). No time to lose in the search for an HIV vaccine. **[Em linha]. Disponível em** <http://www.unaids.org/en/resources/presscentre/pressreleaseandstatementarchive/2013/may/20130518psworldhivvaccine> >. **[Consultado em 24/07/2015]**.

Voronin,Y. & Snow,W. (2013). Organizing the HIV vaccine development effort. *Current Opinion in HIV and AIDS*, 8(5).

Wang,H.-B. *et alii* (2015). HIV Vaccine Research: The Challenge and the Way Forward. *Journal of Immunology Research*, 2015(503978), pp.1–5.

Watkins,D.I. (2012). Update on Progress in HIV Vaccine Development. *Journal Topics in Antiviral Medicine*, 20(2), pp.30–31.

WebMD (2014). Screening Tests for HIV Diagnosis and Treatment: HIV Screening Tests After Diagnosis continued. **[Em linha]. Disponível em** <http://www.webmd.com/hiv-aids/hiv-aids-screening?page=3&rdspk=active>>. **[Consultado em 24/07/2015]**

WHO (2014a). Global Health Observatory (GHO) data. **[Em linha]. Disponível em** <http://www.who.int/gho/hiv/en/>>. **[Consultado em 24/05/2015]**

WHO (2014b). The top 10 causes of death. **[Em linha]. Disponível em**
<<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>>. [Consultado em 24/05/2015

Woodland, D.L. (2004). Jump-starting the immune system: prime–boosting comes of age. *TRENDS in Immunology*, 25(2).

Zuckerman, J.N. (2000). The importance of injecting vaccines into muscle : Different patients need different needle sizes. *BMJ*, 321, pp.1237–8.